

Kälteschockadaptation von *Bacillus subtilis*:
Identifizierung kälteinduzierter Gene und Proteine
und Untersuchung ihrer kältespezifischen Funktion und Regulation

Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Carsten Ludger Beckering

aus Borken/NRW

Marburg an der Lahn, 2004

Vom Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am angenommen

Erstgutachter: Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel
Zweitgutachter Prof. Dr. Lars O. Essen

Tag der mündlichen Prüfung: 19.3.2004

Zusammenfassung

Die Kälteschockadaptation erfolgt in Mikroorganismen nach einem rapiden Abfall der Umgebungstemperatur. Ein Temperaturschock von 37°C auf 15°C hat sich zur Untersuchung der Kälteschockantwort in mesophilen Bakterien durchgesetzt. *B. subtilis* reagiert auf diesen Kälteschock mit der globalen Veränderung seiner Genexpression. Diese Veränderung führt in dem kältegeschockten Bakterium zu einer Anpassung seiner Zellphysiologie, die ihm das Wachstum bei niedrigen Temperaturen ermöglicht. Dabei schützt *B. subtilis* die Funktion seiner kälteempfindlichen Systeme durch die rasche Induktion kalteprotektiver Proteine. Zu den bekannten kälteempfindlichen Systemen in *B. subtilis* gehören die Translationsinitiation und die Proteinbiosynthese am Ribosom, die Faltung von mRNA durch die Bildung kältestabilisierter Sekundärstrukturen und die abnehmende Fluidität der Zellmembran und dadurch bedingten Funktionsverlust der membrangekoppelten Prozesse.

In dieser Arbeit wurden bislang unbekannte kalteinduzierte Proteine und Gene aus *B. subtilis* durch systematische Untersuchungen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und genomweiter Transkriptionsanalyse identifiziert. Diese kalteinduzierten Gene wurden auf eine Beteiligung an der Kälteschockanpassung untersucht. Ein kaltespezifischer Phänotyp konnte für eine $\Delta yplP$ -Mutante und eine $\Delta yqfR/\Delta ydbR$ -Doppelmutante beobachtet werden. Das *yplP*-Gen kodiert für einen von fünf homologen σ^L -abhängigen Transkriptionsaktivatoren in *B. subtilis*, dessen Rolle für die Kälteschockanpassung noch nicht geklärt werden konnte. Die Gene *yqfR* und *ydbR* kodieren für DEAD-Box mRNA-Helikasen, die bereits in mehreren Organismen als kalteinduzierte Proteine identifiziert wurden. In dieser Arbeit durchgeführte fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von GFP-Fusionen konnten die transkriptionsabhängige Kolokalisierung der Helikasen YdbR und YqfR aus *B. subtilis* mit den CSP und Ribosomen an den Zellpolen zeigen. Ausgehend von diesem Experiment wird ein Modell vorgeschlagen, in dem die RNA-Helikasen kältestabilisierte Sekundärstrukturen von mRNA entwinden. Danach kann die mRNA von den CSP gebunden werden, wodurch die Translationsinitiation bei niedrigen Temperaturen erleichtert wird.

Außerdem wurde in dieser Arbeit die Regulation der Fettsäuredesaturase Des aus *B. subtilis* untersucht. Die Desaturase Des erhöht die Fluidität der Zellmembran nach Kälteschock durch die Synthese ungesättigter Fettsäuren in der Membran. Genetische Experimente konnten zeigen, dass die Transkription des *des* Gens durch das temperatursensitive Zweikomponentensystem DesKR aus *B. subtilis* reguliert wird. Die kaltespezifische Regulation weiterer Gene durch DesKR konnte ausgeschlossen werden.

Ein Teil der vorliegenden Arbeit wurde bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Beckering, C.L., Steil, L., Weber, M.H., Völker, U. und Marahiel, M.A. (2002). Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**(22), 6395-402.

Beckering, C.L., Graumann, P. und Marahiel, M.A. (2004). Polar localization of cold-induced DEAD-box RNA-Helikases YdbR and YqfR of *Bacillus subtilis*. Manuscript in preparation.

Weitere Publikationen:

Hunger, K., Beckering, C.L. und Marahiel, M.A. (2004). Genetic evidence for the temperature-sensing ability of the membrane domain of the *Bacillus subtilis* histidine kinase DesK. *FEMS Microbiol Lett* **230**, 41-46.

Weber, M.H., Beckering, C.L. und Marahiel, M.A. (2001a). Complementation of cold shock proteins by translation initiation factor IF1 *in vivo*. *J Bacteriol* **183**(24), 7381-6.

Wendrich, T.M., Beckering, C.L. und Marahiel, M.A. (2000). Characterization of the *relA/spoT* gene from *Bacillus stearothermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **190**(2), 195-201.

Beckering, C.L., Rosair, M. und Weller, A.S. (1998). Ferrocenyl substituted carboranes: synthesis and characterization. *J Organomet Chem* **556**, 55-66.

Meinen Eltern ...

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition der Kälteschockantwort	1
1.2	Die Kälteschockantwort in Mikroorganismen	2
1.2.1	Die Kälteschockproteine CSP	2
1.2.2	DEAD-Box RNA-Helikasen	5
1.2.3	Membrananpassung in der Kälte	7
1.2.4	DNA-Topologie in der Kälte	8
1.3	Detektion und Regulation der Kälteschockantwort	10
1.4	Die Kälteschockantwort in <i>Bacillus subtilis</i> JH642	13
1.5	Aufgabenstellung	14
2	Material	15
2.1	Geräte	15
2.2	Enzyme, Chemikalien und Kits	16
2.3	Vektoren	17
2.3.1	pBluescript	17
2.3.2	pQE60/70/30	17
2.3.3	pREP4	18
2.3.4	pBAD202	18
2.3.5	pX	19
2.3.6	pXkan	19
2.3.7	pSG1151	20
2.3.8	pΔTE	20
2.3.9	pDG783	21
2.3.10	pDG647	21
2.4	Mikroorganismen	22
2.5	Medien	23
2.6	Medienzusätze	24
2.7	Antibiotika	24
3	Methoden	25
3.1	Präparation chromosomaler DNA	25
3.2	Plasmidpräparation	26
3.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
3.4	DNA-Präparation aus PCR-Ansätzen	27
3.5	Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen	28
3.6	Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen	28
3.7	Agarosegelelektrophorese	29

3.8	Ligation von DNA-Fragmenten	29
3.9	Konzentrationsbestimmung von DNA	30
3.10	Vorbereitung von RbCl₂ kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	30
3.11	Transformation von RbCl₂ kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	30
3.12	Vorbereitung von <i>E. coli</i> Zellen zur Elektrotransformation	31
3.13	Transformation von <i>E. coli</i>-Zellen durch Elektroporation	31
3.14	Transformation kompetenter <i>B. subtilis</i>-Zellen	32
3.15	DNA-Sequenzierung	32
3.16	PCR-Generierung von DNA Fragmenten für Gendeletionen	33
3.17	Arbeiten mit RNA	35
3.17.1	Zellkultivierung und Probenentnahme für RNA Präparation	35
3.17.2	Zellaufschluß für RNA Präparation	36
3.17.3	RNA-Extraktion mit der „Saure Phenol“-Methode	36
3.18	Northernblotanalyse	37
3.18.1	Erstellen einer digoxigeninmarkierten RNA Sonde	37
3.18.2	Gießen von Agarosegelen zur RNA Trennung	37
3.18.3	Probenvorbereitung von RNA für Agarosegele	38
3.18.4	Aufbereitung von RNA Agarosegelen	38
3.18.5	RNA-Hybridisierung und Waschen	38
3.18.6	Detektion	39
3.19	Transkriptionsanalyse von <i>B. subtilis</i> mit Mikroarrays	40
3.19.1	Isolation der gesamten RNA aus <i>B. subtilis</i>	40
3.19.2	Reverse Transkription und Markierung	40
3.19.3	Hybridisierung der cDNA	41
3.19.4	Detektion der Mikroarray-Signale	41
3.19.5	Auswertung der Mikroarraydaten	41
3.20	Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine	42
3.20.1	Genexpression in pQE Vektoren	42
3.20.2	Genexpression in pBAD-Vektoren	42
3.20.3	Zellaufschluss mit der French Press	42
3.20.4	Affinitätschromatographie von His ₆ -tag Proteinen	43
3.21	SDS-PAGE	44
3.21.1	Probenvorbereitung für SDS-PAGE	45
3.21.2	Proteinfärbung in Polyacrylamidgelen	45
3.22	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)	45
3.22.1	Zellkultivierung und Probenentnahme für Coomassie/Silber 2D-Gele	46
3.22.2	Zellaufschluss von Proben für Coomassie/Silber 2D-Gele	46
3.22.3	Gefriertrocknung von Proben für Coomassie/Silber 2D-Gele	47
3.22.4	Quantifizierung von Proben für Coomassie/Silber 2D-Gele	47
3.22.5	Zellkultivierung und Probenentnahme für „pulse-chase“ markierte ³⁵ S-Gele	47
3.22.6	Zellaufschluss von Proben für ³⁵ S-Gele	48
3.22.7	Quantifizierung von Proben für ³⁵ S-Gele	49
3.22.8	Gefriertrocknung von Proben für ³⁵ S-Gele	49
3.22.9	Erste Dimension 2D-Gele: Isoelektrische Fokussierung (IEF)	49
3.22.10	Rehydratisierung der IPG-Strips	49

3.22.11	Fokussierung der <i>IPG-Strips</i>	50
3.22.12	Zweite Dimension 2D-Gele: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	50
3.22.13	Gießen von 2D-Gelen (<i>Gelcasting</i>)	51
3.22.14	Äquilibrierung und Auflegen der <i>IPG-Strips</i>	52
3.22.15	2D-Gel Lauf	53
3.22.16	Coomassie-Färbung von 2D-Gelen	53
3.22.17	Silber-Färbung von 2D-Gelen	54
3.22.18	Autoradiographie von ³⁵ S-markierten Gelen	54
4	Ergebnisse	56
4.1	Untersuchungen zur Membranadaptation von <i>B. subtilis</i>	56
4.1.1	Strategie zu Untersuchung der Regulation von <i>des</i>	56
4.1.2	Konstruktion der <i>desK</i> Deletionsmutante CB10	57
4.1.3	Wachstumseigenschaften der <i>desK</i> Deletionsmutante CB10	57
4.1.4	Northernblotanalyse der <i>desK</i> Deletionsmutante CB10	58
4.2	Untersuchungen zur allgemeinen Kälteschockregulation durch das Zweikomponentensystem DesKR aus <i>B. subtilis</i>	62
4.2.1	Strategie zur Identifizierung des DesKR Regulons	62
4.2.2	Genomweite Transkriptionsanalyse der <i>desK</i> Deletionsmutante CB10	62
4.3	Identifizierung kälteinduzierter Gene in <i>B. subtilis</i>	66
4.3.1	Strategie zur Identifizierung kälteinduzierter Gene in <i>B. subtilis</i>	66
4.3.2	Genomweite Transkriptionsanalyse von kältegeschocktem <i>B. subtilis</i> JH642 durch DNA Arrays	66
4.3.3	Proteomanalyse von kältegeschocktem <i>B. subtilis</i> JH642 durch zweidimensionale Gelelektrophorese	70
4.4	Untersuchung kälteinduzierter Gene aus <i>B. subtilis</i> JH642	72
4.4.1	Strategie zur Charakterisierung kälteinduzierter Gene	72
4.5	Untersuchung von <i>yplP</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642	73
4.5.1	Northernblotanalyse von <i>yplP</i>	74
4.5.2	Konstruktion der <i>yplP</i> Deletionsmutante CB15	75
4.5.3	Wachstumseigenschaften der <i>yplP</i> Deletionsmutante CB15	75
4.6	Untersuchung von <i>ylaG</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642	76
4.6.1	Northernblotanalyse von <i>ylaG</i>	77
4.6.2	Konstruktion der <i>ylaG</i> Deletionsmutante CB16	78
4.6.3	Wachstumseigenschaften der <i>ylaG</i> Deletionsmutante CB16	78
4.7	Untersuchung von <i>yorG</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642	79
4.8	Untersuchung von <i>ydeB</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642	80
4.8.1	Konstruktion der <i>ydeB</i> Deletionsmutante CB18	80
4.8.2	Wachstumseigenschaften der <i>ydeB</i> Deletionsmutante CB18	80
4.9	Untersuchung von <i>yhfH</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642	81
4.9.1	Konstruktion der <i>yhfH</i> Deletionsmutante CB19	82
4.9.2	Wachstumseigenschaften der <i>yhfH</i> Deletionsmutante CB19	82
4.10	Untersuchung von <i>ydjO</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642	83
4.10.1	Konstruktion der <i>ydjO</i> Deletionsmutante CB20	83
4.10.2	Wachstumseigenschaften der <i>ydjO</i> Deletionsmutante CB20	84

4.11	Untersuchung von <i>veg</i> aus <i>B. subtilis</i> JH642	84
4.11.1	Konstruktion der <i>veg</i> Deletionsmutante CB21	85
4.11.2	Wachstumseigenschaften der <i>veg</i> Deletionsmutante CB21	85
4.12	Untersuchung der DEAD-Box Helikasen YdbR und YqfR	86
4.12.1	Identifizierung der DEAD-Box Helikasen YdbR und YqfR	86
4.12.2	Sequenzuntersuchung des 5' untranslatierten Bereichs von YdbR und YqfR	88
4.12.3	Konstruktion der <i>ydbR</i> Deletionsmutante CB30	88
4.12.4	Konstruktion der <i>yqfR</i> Deletionsmutante CB40	89
4.12.5	Wachstum der <i>ydbR</i> und <i>yqfR</i> Deletionsmutanten CB30 und CB40	89
4.12.6	Konstruktion einer <i>ydbR yqfR</i> Doppelmutante	90
4.12.7	Konstruktion der induzierbaren <i>ydbR yqfR</i> Doppelmutante CB3441	92
4.12.8	Wachstum der induzierbaren <i>ydbR yqfR</i> Doppelmutante CB3441	93
4.12.9	Northernblotanalyse der induzierbaren <i>ydbR yqfR</i> Doppelmutante CB3441	95
4.12.10	Expression von <i>ydbR</i> und <i>yqfR</i>	97
4.12.11	Lokalisation von YqfR und YdbR durch Fluoreszenzmikroskopie	99
5	Diskussion	103
5.1	Die Kälteadaptation der Zellmembran in <i>B. subtilis</i>	103
5.1.1	Die Regulation der Fettsäuredesaturase Des aus <i>B. subtilis</i>	103
5.2	Das Zweikomponentensystem DesKR ist kein allgemeiner Kältesensor	104
5.2.1	Warum hat die Desaturase ein eigenes Zweikomponentensystem?	105
5.3	Identifizierung neuer kälteinduzierter Proteine und Gene	106
5.3.1	Funktionelle Einordnung kälteinduzierter und kältereprimierter Gene	107
5.3.2	Mangel durch Hitzeschock / Überfluss durch Kälteschock?	111
5.4	Funktionelle Charakterisierung kälteinduzierter Gene	112
5.4.1	Charakterisierung von <i>yplP</i>	113
5.4.2	Charakterisierung von <i>ylaG</i> , <i>ydeB</i> , <i>yhfH</i> , <i>ydjO</i> und <i>veg</i>	113
5.4.3	Warum zeigen die wenigsten Deletionsmutanten einen Wachstumsdefekt ?	114
5.4.4	Charakterisierung der kälteinduzierten RNA-Helikasen YdbR und YqfR	115
6	Literatur	119
7	Anhang	126
7.1	Primer	126

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1-1 Proteinbiosynthese vor und nach Kälteschock	2
Abbildung 1.2-1 β -barrel Struktur von CspB aus <i>B. subtilis</i>	3
Abbildung 1.2-2 Kälteschockproteine als mRNA Chaperone	4
Abbildung 1.2-3 Fettsäurereste in der Membran vor und nach Kälteschock	8
Abbildung 1.2-4 Superspiralisierte DNA	9
Abbildung 1.3-1 Temperaturdetektion und Kälteschockregulation in der Zelle	10
Abbildung 1.3-2 Modell für das Ribosom als Temperatursensor	11
Abbildung 1.4-1 <i>Bacillus subtilis</i> JH642 im Lichtmikroskop	13
Abbildung 4.1-1 Wachstumskurve von CB10 nach Kälteschock	58
Abbildung 4.1-2 Zeitabhängige Transkription von <i>des</i> nach Kälteschock	59
Abbildung 4.1-3 Northernblot von <i>des</i> in JH642 und CB10 bei 37°C und 15°C	60
Abbildung 4.1-4 Regulation der Fettsäuredesaturase <i>Des</i> aus <i>B. subtilis</i>	61
Abbildung 4.2-1 Kapillarelektrophorese zur Qualitätskontrolle der mRNA	63
Abbildung 4.2-2 Northernblot von <i>cspB</i> und <i>groEL</i> in <i>B. subtilis</i> JH642 und CB10	64
Abbildung 4.2-3 Scatter-Diagramme der DNA Arrayanalyse des <i>DesKR</i> Regulons	65
Abbildung 4.3-1 Repräsentativer Ausschnitt aus einem Falschfarbenoverlay der Arrays	67
Abbildung 4.3-2 2D-Gel Überlagerung von <i>B. subtilis</i> JH642 37°C und 15°C	71
Abbildung 4.5-1 σ^L abhängige Transkriptionsaktivatoren in <i>B. subtilis</i>	73
Abbildung 4.5-2 Northernblot von <i>yplP</i> aus <i>B. subtilis</i> vor und nach Kälteschock	74
Abbildung 4.5-3 Wachstumskurve von <i>B. subtilis</i> JH642 und CB15 nach Kälteschock	76
Abbildung 4.6-1 Northernblot von <i>ylaG</i> aus <i>B. subtilis</i> vor und nach Kälteschock	77
Abbildung 4.6-2 Wachstumskurve der <i>ylaG</i> Deletionsmutante CB16 bei 37°C und 15°C	79
Abbildung 4.8-1 Wachstumskurve der <i>ydeB</i> Deletionsmutante CB18 bei 37°C und 15°C	81
Abbildung 4.9-1 Wachstumskurve der <i>yhfH</i> Deletionsmutante CB19 bei 37°C und 15°C	82
Abbildung 4.10-1 Wachstumskurve der <i>ydjO</i> Deletionsmutante CB20 bei 37°C und 15°C	84
Abbildung 4.11-1 Wachstumskurve der <i>veg</i> Deletionsmutante CB21 bei 37°C und 15°C	85
Abbildung 4.12-1 Sequenzvergleich der konservierten zentralen Helikasedomäne	87
Abbildung 4.12-2 Sequenzvergleich des <i>cold-box</i> Elements von Helikasen und CSP	88
Abbildung 4.12-3 Wachstum von CB30 und CB40 bei 37°C und 15°C	90
Abbildung 4.12-4 Strategie zur Konstruktion einer <i>ydbR yqfR</i> Doppelmutante	91
Abbildung 4.12-5 Konstruktion der induzierbaren <i>ydbR yqfR</i> Doppelmutante CB3441	92
Abbildung 4.12-6 Wachstumskurve der induzierbaren <i>ydbR yqfR</i> Doppelmutante CB3441	94
Abbildung 4.12-7 Dotblotanalyse der Transkription von <i>yqfR</i> in CB3441	96
Abbildung 4.12-8 Expression und Reinigung von Thio-YdbR-His ₆	98
Abbildung 4.12-9 Fluoreszenzmikroskopie von CB50 (<i>ydbR-gfp</i>)	100
Abbildung 4.12-10 Fluoreszenzmikroskopie von CB51 (<i>yqfR-gfp</i>)	100
Abbildung 4.12-11 Fluoreszenzmikroskopie von YdbR-Gfp und YqfR-Gfp	101
Abbildung 5.1-1 Modell zur <i>feedback</i> -Regulation von <i>desKR</i>	104
Abbildung 5.2-1 <i>DesKR</i> reguliert die Membranfluidität in <i>B. subtilis</i>	106
Abbildung 5.3-1 Übersicht zur Kälteschockadaptation in <i>B. subtilis</i>	112
Abbildung 5.4-1 Homologe und analoge Anpassungssysteme	115
Abbildung 5.4-2 Modell zur Arbeitsteilung von CSP und Helikasen	118

1 Einleitung

Mikroorganismen wachsen in Lebensräumen, die von verschiedenen Umweltparametern bestimmt werden. Dazu zählen Temperatur, Sonneneinstrahlung, Feuchtigkeit und Nahrungsangebot. Die Grenzen des Temperaturbereiches und das Temperaturoptimum für das Wachstum sind dabei charakteristisch für den jeweiligen Mikroorganismus. Es wird zwischen psychrophilen Mikroorganismen, die bei Temperaturen unter 20°C wachsen, mesophilen Mikroorganismen mit Wachstum zwischen 20°C und 40°C und thermophilen Mikroorganismen unterschieden, die bevorzugt bei Temperaturen über 40°C wachsen. Durch Tag- und Nachtwechsel, Wetteränderungen und jahreszeitliche Unterschiede sind die Mikroorganismen ständig wechselnden Temperaturen ausgesetzt, die eine fortwährende Anpassung der Zelle erfordern.

1.1 Definition der Kälteschockantwort

Als Kälteschockantwort bezeichnet man bei Mikroorganismen die physiologische Anpassungsreaktion an sinkende Umgebungstemperaturen. Erniedrigt sich die Umgebungstemperatur, kommt es zu einer Störung des Fließgleichgewichtes in der Zelle. Darauf reagiert die Zelle mit einer Anpassungsreaktion, bis sich ein neues Fließgleichgewicht bei der niedrigeren Temperatur eingestellt hat. Es lassen sich daraus drei Phasen definieren: (1) Optimiertes Wachstum bei hoher Temperatur, (2) Anpassungsphase mit Kälteschockantwort bei sinkender Temperatur, (3) optimiertes Wachstum bei niedriger Temperatur. Für die Ausprägung der Kälteschockantwort ist im Allgemeinen die Temperaturdifferenz wichtiger als die absolute Temperatur.

Nach einem Kälteschock wird bei Mikroorganismen während der Anpassungsphase zunächst ein Rückgang der allgemeinen Proteinbiosynthese beobachtet (Jones *et al.*, 1987). Erst nach der Akklimatisierung an die tiefe Temperatur nimmt die Proteinbiosynthese wieder zu. Dagegen werden nach dem Kälteschock eine Reihe von Proteinen verstärkt produziert (*CIP = cold induced proteins*). Die Kälteinduktion von Proteinen in *Bacillus subtilis* (Lottering & Streips, 1995; Graumann *et al.*, 1996), *Bacillus stearothermophilus* (Wu & Welker, 1991), *Listeria* (Phan-Thanh & Gormon, 1995) und *Rhizobium* (Cloutier *et al.*, 1992) wurde mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese untersucht. Nach erfolgter Akklimatisierung kann deren Induktion zum Teil wieder gedrosselt werden. Dieser Sachverhalt ist in Abbildung 1.1-1 schematisch dargestellt.

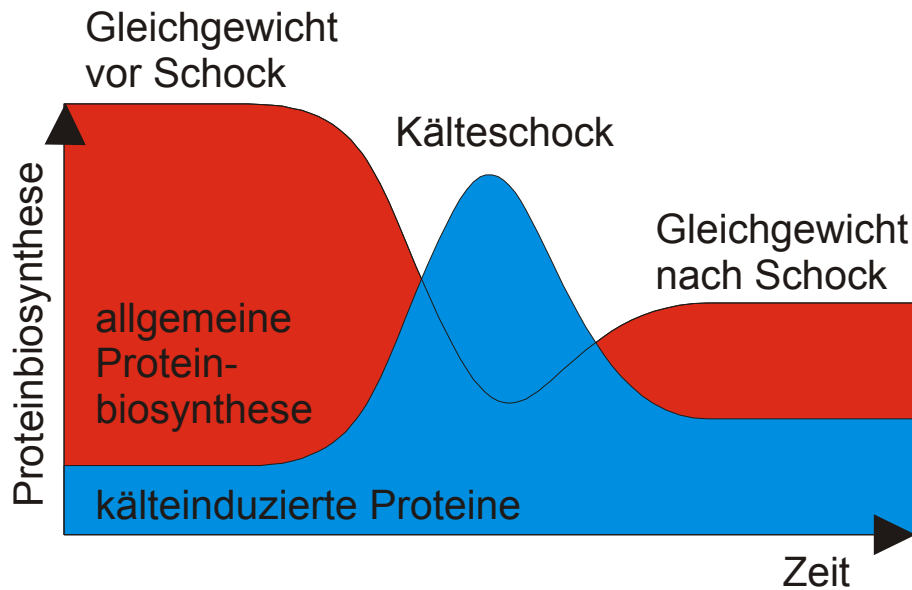


Abbildung 1.1-1 Proteinbiosynthese vor und nach Kälteschock

1.2 Die Kälteschockantwort in Mikroorganismen

Sinkende Temperaturen stören die reguläre Funktion vieler intrazellulärer Prozesse. Dies wird nach einem Kälteschock deutlich durch den temporären Wachstumsstopp des mesophilen Bakteriums *E. coli* (Jones *et al.*, 1987) und des psychrotoleranten *Yersinia enterocolitica* (Neuhaus *et al.*, 2000). Experimente mit strukturierten mRNAs konnten zeigen, dass die Initiation der Translation bei niedrigen Temperaturen zu einem limitierenden Faktor für das Bakterienwachstum wird (Broeze *et al.*, 1978). Dabei wurde die Translationsinitiation maßgeblich durch kältestabile Sekundärstrukturen der mRNA behindert (Hall *et al.*, 1982; Wulff *et al.*, 1984; Graumann *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1997). Folglich nimmt die Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese bei niedrigen Temperaturen stark ab.

Bei sinkenden Temperaturen sind auch die biophysikalischen Eigenschaften der Zellmembran betroffen. Bei niedrigen Temperaturen droht sie zu erstarren mit der Folge, dass an die Membran gekoppelten Prozesse ihre Funktion verlieren und die Zelle schließlich lysiert (Grau & de Mendoza, 1993; Klein *et al.*, 1999; Aguilar *et al.*, 2001).

Mikroorganismen haben eine Reihe von spezifische Mechanismen entwickelt, um ihr Wachstum bei niedrigen Temperaturen zu ermöglichen (Graumann & Marahiel, 1996; Weber & Marahiel, 2003). Diese Mechanismen werden nachfolgend beschrieben.

1.2.1 Die Kälteschockproteine CSP

Zu den meist untersuchten und am stärksten kälteinduzierten Proteinen gehören die kleinen, sauren, nukleinsäurebindenden Kälteschockproteine CSP (*cold-shock protein*) (Jiang *et al.*, 1993; Graumann & Marahiel, 1994; Jiang *et al.*, 1997; Graumann & Marahiel, 1998).

Die CSP wurden mit Ausnahme von Archaea und Cyanobakterien in allen bislang untersuchten mesophilen, thermophilen und psychophilen Bakterien gefunden. Sie sind selbst in den evolutionsgeschichtlich sehr frühen Mikroorganismen wie *Thermotoga* und *Aquifex* vorhanden, was ihre grundlegende Bedeutung für die Zelle unterstreicht (Graumann *et al.*, 1998). Je nach Mikroorganismus kommen sie in unterschiedlicher Kopienzahl und verschiedener Homologie vor. Darüber hinaus stellen die CSP das Modell für die Kälteschockdomäne dar, die vom Bakterium bis zum Menschen konserviert ist (Wistow, 1990; Wolffe *et al.*, 1992).



Abbildung 1.2-1 β -barrel Struktur von CspB aus *B. subtilis*

Mittels Röntgenstrukturbestimmung und NMR wurden die Strukturen von CspB aus *B. subtilis* (siehe Abbildung 1.2-1) (Schindelin *et al.*, 1993; Schnuchel *et al.*, 1993), CspA aus *E. coli* (Newkirk *et al.*, 1994; Schindelin *et al.*, 1994), CspB aus dem thermophilen *Bacillus caldolyticus* (Perl *et al.*, 2000) und TmCsp aus dem hyperthermophilen *Thermotoga maritima* (Kremer *et al.*, 2001) bestimmt. Die CSP bestehen aus etwa 70 Aminosäuren, die ein β -barrel aus fünf antiparallelen β -Faltblättern bilden. An der Nukleinsäurebindung sind zwei Sequenzmotive RNP1 (KGFGIEV) und RNP2 (VFVH) mit oberflächenexponierten, basischen und aromatischen Aminosäureresten beteiligt, die auf den β -Faltblättern 2 und 3 lokalisiert sind (Graumann *et al.*, 1994; Schröder *et al.*, 1995; Hanna & Liu, 1998; Lopez *et al.*, 1999; Phadtare & Inouye, 1999b; Lopez & Makhatadze, 2000).

Diese nukleinsäurebindenden Eigenschaften gaben den Anstoß für die Entwicklung eines Modells der CSP aus *B. subtilis* als RNA Chaperone (siehe Abbildung 1.2-2) (Graumann *et*

al., 1997). Dies konnte für CspA aus *E. coli* auch *in vitro* demonstriert werden (Jiang *et al.*, 1997). Demnach verhindert die unspezifische Bindung der CSP an mRNA die Ausbildung von mRNA-Sekundärstrukturen, die die Translation am Ribosom stören würden. Weil die Stabilität der Sekundärstrukturen bei niedrigen Temperaturen zunimmt, ist dieser Prozess ein wichtiger Aspekt der Kälteschockantwort. Es sei hier schon darauf hingewiesen, dass die CSP nur einzelsträngige Nukleinsäuren binden können (Graumann *et al.*, 1996) und deshalb keine schon vorhandenen mRNA Sekundärstrukturen auflösen vermögen (siehe Abschnitt 1.2.2). Da gerade die Initiation der Translation als limitierender Faktor für das Wachstum in der Kälte beschrieben wurde (Broeze *et al.*, 1978), ist es bemerkenswert, dass die heterologe Expression des Initiationsfaktors IF1 aus *E. coli* in *B. subtilis* den Wachstumsdefekt einer *cspB/cspC* Doppelmutante aufheben kann (Weber *et al.*, 2001a). Demnach könnten die CSP zumindest bei tiefen Temperaturen eine Rolle bei der Initiation der Translation spielen. Außerdem wurden CSP in *Streptomyces aureofaciens* zusammen mit Ribosomen isoliert (Mikulik *et al.*, 1999). Weiterhin konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie einer CspB-Gfp (*green fluorescing protein*) Fusion eine transkriptionsabhängige Kolokalisierung von CSP und Ribosomen in *B. subtilis* nachgewiesen werden (Mascarenhas *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2001c). Nach der Zugabe des Transkriptionshemmers Rifampicin ging dabei die deutliche Lokalisierung an den Zellpolen sowohl der Ribosomen als auch der CSP verloren und beide verteilten sich homogen über die ganze Zelle. Diese fluoreszenzmikroskopischen Experimente unterstützen das Modell, nachdem die CSP zwischen Transkription und Translation vermitteln. Darüber hinaus lassen sie die These zu, dass eine überwiegend polare Lokalisierung von Proteinen ein Indiz für deren Beteiligung an der Translation ist, zumal für Gfp und andere cytosolische Proteine eine homogene Verteilung in der Zelle gezeigt wurde (Lewis *et al.*, 2000; Mascarenhas *et al.*, 2001).

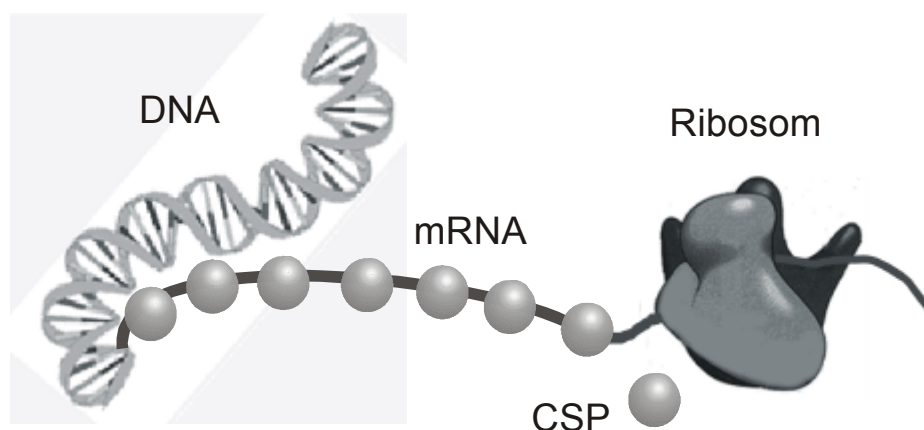


Abbildung 1.2-2 Kälteschockproteine als mRNA Chaperone

1.2.2 DEAD-Box RNA-Helikasen

1.2.2.1 Die Superfamilie der DEAD-Box Helikasen

Die DEAD-Box RNA-Helikasen bilden eine Untergruppe der Superfamilie der Helikasen (Superfamilie II), die sowohl in Prokaryoten, Eukaryoten und Archaea vorkommen. Helikasen sind an diversen Prozessen in der Zelle beteiligt, wie z.B. der Translationsinitiation (*Mus musculus* eIF-4AI, eIF-4AII), Ribosomenassemblierung (*Saccharomyces cerevisiae* Spb4, *E. coli* SrmB), RNA *splicing* (*S. cerevisiae* Mss116, Prp2, Prp5, Prp16, Prp22, Prp28) und mRNA Abbau (*E. coli* RhlB) (Schmid & Linder, 1992; Gorbatenya & Koonin, 1993). Die Bezeichnung der DEAD-Box Helikasen ist von dem größtenteils konservierten DEAD-Motiv (Asp-Glu-Ala-Asp) abgeleitet. Eine Unterform davon bildet die DEAH-Variante. Charakteristisch für die DEAD-Box Helikasen ist eine zentrale Region mit 294-359 Aminosäuren, die acht konservierte Sequenzmotive enthält. Vier der acht Motive wurden bereits auf ihre Funktion der ATP-Bindung und -Hydrolyse experimentell untersucht (Rozen *et al.*, 1989; Luking *et al.*, 1998), unter anderem das erste (AxxGxGKT), ein Walker A Motiv (Walker *et al.*, 1982), das namensgebende fünfte (DEAD), ein modifiziertes Walker B Motiv (Walker *et al.*, 1982) sowie die Motive sechs und acht. Zudem haben die Mitglieder dieser Familie N- und C-terminale Domänen unterschiedlicher Länge. Der phylogenetische Vergleich der N- und C-Termini verschiedener DEAD-Box Helikasen innerhalb eines Organismus, z.B. *E. coli* CsdA, DbpA, RhlE, RhlB und SmrB zeigt keine offensichtliche Gruppierung (Lim *et al.*, 2000), obwohl angenommen wird, dass die DEAD-Box Helikasen von einem gemeinsamen Vorgänger abstammen. Die verschiedenen N- und C-Termini werden im Allgemeinen mit den unterschiedlichen Funktionen der Helikasen in der Zelle in Verbindung gebracht. Eine zuverlässige Zuordnung der Funktion von Helikasen über die N- und C-terminale Domäne ist bislang aber noch nicht in größerem Maßstab erfolgt.

1.2.2.2 Biochemische Charakterisierung von DEAD-Box Helikasen

Die Funktion der DEAD-Box Helikasen ist die Entwindung von doppelsträngiger RNA (dsRNA). Diese Eigenschaft wurde in verschiedenen biochemischen Studien untersucht (Jones *et al.*, 1996; Tsu & Uhlenbeck, 1998; Kossen & Uhlenbeck, 1999; Rogers *et al.*, 1999; Yu & Owtrim, 2000; Tsu *et al.*, 2001; Huang & Liu, 2002). Die meisten Studien beschränken sich auf spektroskopische *in vitro* Assays von ATP Hydrolyse durch nativ aufgereinigte Helikasen angeregt durch dsRNA. Zum Teil wurde auch die Richtung der Entwindung der dsRNA durch die Helikasen bestimmt, die im Fall von ChrC aus *Anabaena* ausschließlich in 5'→3' Richtung (Yu *et al.*, 2000) und bei p68 aus *S. cerevisiae* sogar in beide Richtungen

verläuft (Huang *et al.*, 2002). Für andere Helikasen wie z.B. DbpA aus *E. coli* und *B. subtilis* (früher YxiN) konnte darüber Hinaus eine spezifische Aktivierung durch ein Strukturelement aus der 23S rRNA nachgewiesen werden (Tsu *et al.*, 1998; Kossen *et al.*, 1999; Tsu *et al.*, 2001). Für diese Gruppe von Helikasen wird auch eine Rolle bei der Ribosomenbiogenese diskutiert (Moll *et al.*, 2002). Sie weisen auch eine signifikante Übereinstimmung in der C-terminalen Domäne auf, woraus folgt, dass Helikasen mit gleicher C-terminaler Domäne auch die gleiche Funktion ausüben.

1.2.2.3 Kälteinduzierte DEAD-Box Helikasen

In verschiedenen Organismen wurden kälteinduzierbare DEAD-Box Helikasen identifiziert. Dazu gehören CsdA aus *E. coli* (Jones *et al.*, 1987), ChrC aus dem Cyanobakterium *Anabaena* (Chamot *et al.*, 1999) und DeaD aus dem Archaea *Methanococcoides burtonii* (Lim *et al.*, 2000). Neben der Kälteinduktion von CsdA aus *E. coli* konnte auch dessen Bindung an das Ribosom in kältegeschockten Zellen gezeigt werden. Die Deletion von *csdA* aus *E. coli* führt zu einem gestörten Wachstum und zur Deregulation der Repression von Hitzeschockgenen bei 15°C (Jones *et al.*, 1987). ChrC aus *Anabaena* wird nach einer Temperatursenkung von 30°C auf 20°C induziert (Chamot *et al.*, 1999), DeaD aus *M. burtonii* nach einer Temperaturerniedrigung von 23°C auf 4°C (Lim *et al.*, 2000). Interessanter Weise wurde sowohl für *chrC* als auch *deaD* ein als Kälte-Box bekanntes Motiv im 5'-untranslatierten Bereich identifiziert (Lim *et al.*, 2000). Dieses konservierte Motiv wurde zuerst für die CSP (siehe Abschnitt 1.2.1) entdeckt. Diesem Motiv wird eine Beteiligung bei der Regulation der CSP zugesprochen (Graumann *et al.*, 1998; Phadtare *et al.*, 1999a). Ein Experiment, in dem der 5'-untranslatierte Bereich mit der *cold-box* von *E. coli cspA* exprimiert wurde, zeigte die künstliche Verlängerung der Kälteschockantwort (Jiang *et al.*, 1996). Allerdings konnte diese Beobachtung nicht durch die Expression des 5'-untranslatierten Bereichs von *M. burtonii deaD* in *E. coli* (Lim *et al.*, 2000) reproduziert werden. Die genaue Funktion dieses Motivs ist also noch sicher definiert.

Die Untersuchungen an den DEAD-Box Helikasen implizieren, dass diese Proteine an der Anpassung an niedrige Wachstumstemperaturen beteiligt sind. Dabei spielt ihre Kälteinduzierbarkeit und ihre Funktion als RNA-Chaperone eine Rolle. So wird diskutiert, ob Helikasen die Translationsinitiation bei niedrigen Temperaturen ermöglichen, indem sie aktiv kältestabilisierte Sekundärstrukturen von mRNA entwinden (Jones *et al.*, 1996; Chamot *et al.*, 1999; Lim *et al.*, 2000). Diese Funktion ist naheliegend, zumal Helikasen in Eukaryoten als Translationsinitiatoren identifiziert wurden (*M. musculus* eIF-4A, *S. cerevisiae* Tif1/Tif2) und

gerade die Translationsinitiation als limitierender Schritt für das Wachstum bei niedrigen Temperaturen gilt (Hall *et al.*, 1982; Wulff *et al.*, 1984; Graumann *et al.*, 1997; Jiang *et al.*, 1997). Diese Funktion wird ebenfalls für die CSP angenommen, wobei sie im Gegensatz zu den Helikasen kein ATP umsetzen und deshalb dsRNA nicht aktiv entwinden können. Ein Modell für die CSP beschränkt sich auf präventive Bindung der CSP an einzelsträngige RNA (ssRNA), um die Bildung von dsRNA zu verhindern (siehe Abschnitt 1.2.1).

1.2.3 Membrananpassung in der Kälte

Die Membran setzt sich aus einer Doppelschicht von Phospholipiden zusammen und grenzt das Zellinnere von der Umwelt ab. In der Membran sind zahlreiche Proteine integriert, die essentielle Funktionen ausüben. Dazu gehören unter anderem die Kontrolle über den Stoffaustausch zwischen Zelle und Umgebung, der Aufbau elektrischer Potentiale und die Atmungskette. Die richtige Fluidität der Membran ist für die komplexen Funktionen der Membranproteine entscheidend. Die Fluidität der Membran wird durch die Temperatur beeinflusst. Dementsprechend haben Mikroorganismen Mechanismen entwickelt, die die temperaturbedingte Änderung der Membranfluidität ausgleichen. Dazu wird die Zusammensetzung der Fettsäurereste, die Bestandteil der Phospholipide sind, verändert. Bei sinkender Temperatur werden die Fettsäurereste dahingehend modifiziert, dass die Van-der-Waals Anziehung zwischen ihnen geschwächt wird, wodurch der Schmelzpunkt der Membran sinkt. Das geschieht zum einen durch die Einführung von *cis*-Doppelbindungen in bestehende Fettsäurereste, deren lineares Kohlenstoffgerüst abgelenkt ist, wodurch die Van-der-Waals Interaktion zwischen ihnen vermindert ist. Zum anderen werden verzweigtkettige Fettsäurereste neu für die Membran synthetisiert, die ebenfalls schwächere Anziehungskräfte untereinander haben (siehe Abbildung 1.2-3). Diese genannten Veränderungen der Fettsäurezusammensetzung in der Membran von kältegeschockten Bakterien wurden in verschiedenen Experimenten untersucht (Kaneda, 1991; Aguilar *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2001b).

In *B. subtilis* werden verzweigtkettige Fettsäurereste für die Membrananpassung nach Kälteschock *de novo* synthetisiert (Klein *et al.*, 1999). Die Synthese verläuft unter Verwendung von α -Ketosäuren (Kaneda, 1977; Kaneda, 1991), die durch den Katabolismus von Isoleucin hergestellt werden. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass gerade auch das *bkdR*-Operon kälteinduziert ist (Kaan *et al.*, 2002), da es für die Enzyme des Isoleucinkatabolismus zur Herstellung der α -Ketosäuren kodiert.

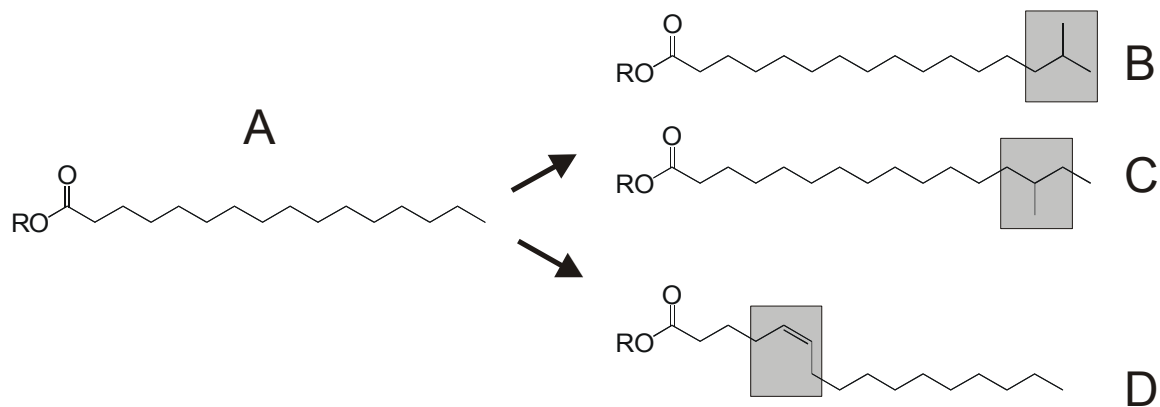


Abbildung 1.2-3 Fettsäurereste in der Membran vor und nach Kälteschock

(A) neo-C16, (B) iso-C16, (C) anteiso-C16, (D) C16:1Δ5-cis

Die Modifikation von gesättigten zu ungesättigten Fettsäureresten in der Membran von *B. subtilis* wird durch die Fettsäure-desaturase Des vorgenommen (Aguilar *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2001b). Die Endprodukte dieses Membranproteins sind ausschließlich Δ5-ungesättigte Fettsäurereste (Altabe *et al.*, 2003). In früheren Untersuchungen wurden auch andere Fettsäuren als Δ5-ungesättigte Fettsäuren nach Kälteschock in der Membran beobachtet (Weber *et al.*, 2001b). Deren Vorkommen ist aber nach den Ergebnissen von Altabe *et al.* höchstens indirekt auf die Aktivität von Des zurückzuführen, vielleicht durch die Aktivität einer Doppelbindung-Isomerase. Die Regulation der Desaturase wird durch die Topologie der DNA bestimmt (siehe Abschnitt 1.2.4). Dies konnte in einem Experiment gezeigt werden, in dem durch Zugabe des Gyraseinhibitors Novobiocin, welcher die negative Superspiralisierung der DNA nach Kälteschock verhindert, die Induktion von Des unterdrückt (Grau *et al.*, 1994). Ein Hinweis auf eine direkte Regulation von Des aus *B. subtilis* ergibt sich aus Untersuchungen zur Signalweiterleitung nach Kälteschock in *Synechocystis*. In diesem Organismus wurden systematisch Zweikomponentensysteme deletiert (Suzuki *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001). Dabei konnte für die beiden Histidinkinasen Hik19 und Hik33 eines Zweikomponentensystems gezeigt werden, dass sie die Transkription der Fettsäure-desaturasegene *desB* und *desD* regulieren. Es bleibt zu untersuchen, ob die Desaturase Des aus *B. subtilis* vielleicht durch ein zu Hik19 und Hik33 homologes Zweikomponentensystem reguliert wird.

1.2.4 DNA-Topologie in der Kälte

Das zirkuläre bakterielle Chromosom ist in superspiralisierten Domänen organisiert. Umweltbedingungen wie Osmolarität, pH Wert, Sauerstoffkonzentration und nicht zuletzt die Temperatur haben Einfluss auf die Superspiralisierung der DNA und damit auch auf die Genexpression. Je ein Beispiel für ein entspanntes und für ein überspiralisiertes Plasmid ist in

Abbildung 1.2-4 zu sehen. Die Expression eines Gens hängt von der Erkennung seines Promotors ab. Die Erkennung der DNA-Sequenz eines Promotors durch ein Protein erfolgt durch die Bindung seiner α -Helix an ein spezifisches Muster von exponierten Basen in der großen Furche der DNA. Bei Superspiralisierung verändert sich die Zahl der Basen pro Helixwindung und folglich verändert sich die Bindungsstärke zwischen Protein und DNA. Durch diesen Mechanismus kann die Expression von Stressgenen reguliert werden.

Nach Kälteschock konnte in *B. subtilis* die Zunahme der negativen Superspiralisierung beobachtet werden (Krispin & Allmansberger, 1995). Übereinstimmend konnte für *E. coli* die Kälteinduktion der DNA-Gyrase nachgewiesen werden (Jones *et al.*, 1992), welche in Bakterien die negative Verwindung der DNA katalysiert. Bei einem Hitzeschock lässt sich für *B. subtilis* genau das Gegenteil beobachten. Der negative Supercoil der DNA wird entspannt (Krispin *et al.*, 1995). Diese Beobachtung ist ein Beispiel für die oft gegensätzlich regulierte Hitze- und Kälteschockantwort. Die Regulation des Desaturasegens *des* aus *B. subtilis* ist ein Beispiel für die topologische Regulation der Genexpression. Durch die Zugabe von Novobiocin, das die negative Superspiralisierung durch Hemmung der DNA-Gyrase inhibiert, wird die Expression von *des* nach Kälteinduktion verhindert (Grau *et al.*, 1994). Dieses Beispiel demonstriert die Bedeutung der negativen Superspiralisierung für die Regulation von Kälteschockgenen. Neben exemplarischen Beispielen liegen aber bislang noch keine systematischen Untersuchungen zur Rolle der DNA-Topologie für die Regulation von Genen für die Kälteanpassung vor.

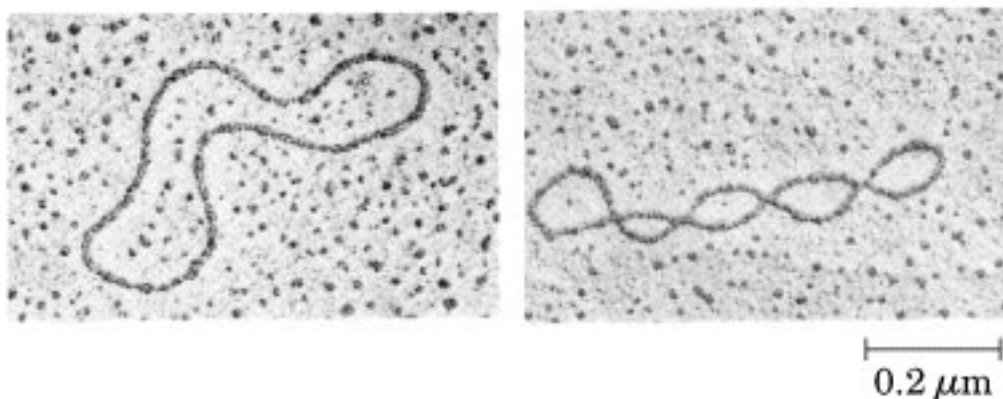


Abbildung 1.2-4 Superspiralisierte DNA

Für die Regulation der Transkription könnte, abgesehen von der Genregulation durch die Superspiralität der DNA, auch die strukturelle Organisation des Chromosoms eine Rolle spielen (Lewis *et al.*, 2000; Mascarenhas *et al.*, 2001). Etwa 80-90% der gesamten Transkription wird für die Synthese stabiler RNA (tRNA und rRNA) verwendet, die in erster

Linie im Inneren des Nukleoids stattfindet. Nur an der Peripherie des Nukleoids ist die Kopplung von Transkription und Translation für eine effiziente Proteinbiosynthese gegeben. Dort wird die mRNA durch die Ribosomen translatiert, so dass die Positionierung von Genen im Nukleoid entscheidend für deren Transkription ist. Die räumliche Trennung von Transkription und Translation konnte durch Fluoreszenzmikroskopie gezeigt werden (Lewis *et al.*, 2000; Mascarenhas *et al.*, 2001). Dabei befinden sich die Ribosomen hauptsächlich an den Zellpolen und umgeben das Nukleoid. Die Lokalisierung der Ribosomen hängt dabei von aktiver Transkription ab, bei deren Hemmung sich die Ribosomen homogen über die Zelle verteilen. Weitergehende Zusammenhänge zwischen der strukturellen Organisation des Chromosoms und Kälteschock sind bislang noch nicht untersucht worden.

1.3 Detektion und Regulation der Kälteschockantwort

Voraussetzung für eine aktive Anpassungsreaktion der Zelle nach einem Kälteschock ist zunächst die Erfassung der Temperaturänderung, damit dann die Signalweiterleitung an die verschiedenen Komponenten des Anpassungssystems und damit dessen Aktivierung erfolgen kann. Für die Signalerfassung und –weiterleitung des Kälteschocks sind zwei unterschiedliche Strategien denkbar. Auf der einen Seite ist dies ein zusammenhängendes Kälteschockregulon mit einem zentralen Temperatursensor und einer sich verzweigenden Signalweiterleitung für die einzelnen Anpassungssysteme. Dem gegenüber wäre auch ein dezentrales System denkbar, bei dem jede Komponente des Anpassungssystems einen separaten Temperatursensor und eine eigene Signalweiterleitung hätte. Für beide Strategien zur Temperaturerfassung und Signalweiterleitung lassen sich Beispiele aus der Kälteschockantwort von Mikroorganismen finden.

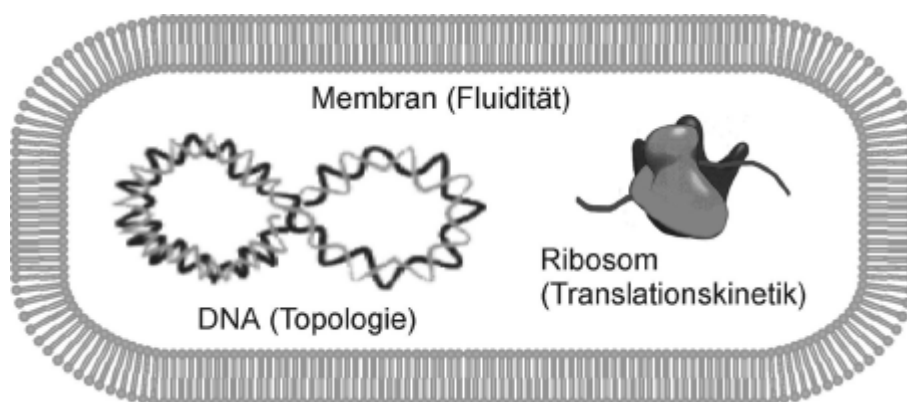


Abbildung 1.3-1 Temperaturdetektion und Kälteschockregulation in der Zelle

Die Zweikomponentensysteme Hik19 und Hik33 aus *Synechocystis* (Suzuki *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001) sind ein Beispiel für die dezentrale Temperaturerfassung und Signalweiterleitung an nur ein spezifisches Anpassungssystem, nämlich der Fettsäure-desaturase.

Das Ribosom ist ein Beispiele für ein zentrales System zur Temperaturerfassung. Dabei spielt die Geschwindigkeit der Translation die entscheidende Rolle (siehe Abbildung 1.3-2). Während bei hohen Temperaturen die Proteinbiosynthese schnell ist und die Menge an aminosäurebeladenen tRNAs abnimmt, verläuft die Proteinbiosynthese bei niedrigen Temperaturen langsam und die Menge an beladenen tRNAs nimmt zu (VanBogelen & Neidhardt, 1990). Diese beiden Zustände am Ribosom können durch das Sensorprotein RelA gemessen werden (Haseltine *et al.*, 1972; Wendrich & Marahiel, 1997; Wendrich *et al.*, 2000; Wendrich *et al.*, 2002). RelA kann durch die Produktion des Botenstoffs ppGpp pleiotrope Effekte in der Zelle auslösen. Kommen bei hoher Temperatur vermehrt unbeladene tRNAs in die A-Stelle des Ribosoms, steigt die Konzentration von ppGpp in der Zelle. Bei niedrigen Temperaturen mit mehrheitlich beladenen tRNAs sinkt die ppGpp Konzentration. Der genaue Zusammenhang zwischen Hitzeschock, Kälteschock und der Regulation durch RelA ist aber noch nicht bekannt.

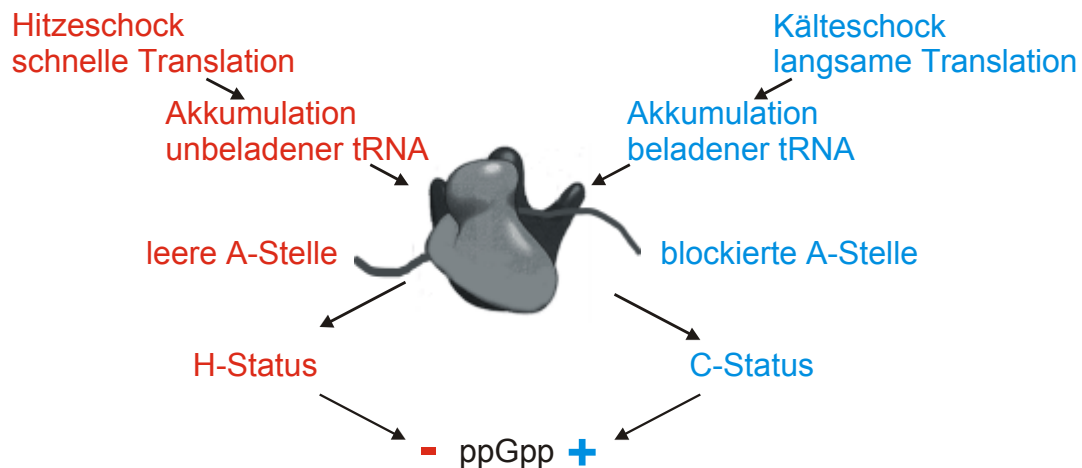


Abbildung 1.3-2 Modell für das Ribosom als Temperatursensor

Generell werden die Kinetiken aller zellulären Prozesse in unterschiedlichem Maß durch die Temperaturerniedrigung beeinflusst. Dies kann die Zelle zur Regulation auf verschiedenen Ebenen nutzen. So kann z.B. durch die temperaturabhängige Änderung der Bindung von Transkriptionsaktivatoren an Promotoren die Transkription von Genen kontrolliert werden. Dies gilt in dreierlei Hinsicht: (1) Die Bindungskinetik verlangsamt sich auch ohne Strukturveränderung von Protein oder DNA. (2) Eine durch Temperaturerniedrigung bedingte

Strukturveränderung des Regulatorproteins verändert dessen Affinität zum Promotor. (3) Die Struktur der DNA verändert sich und ändert ihre Affinität zum Regulatorprotein. Der dritte Fall ist durch die Veränderung der DNA-Topologie gegeben und wurde für *B. subtilis* und *E. coli* nach Kälteschock beschrieben (siehe Abschnitt 1.2.4).

Sekundärstrukturen in der mRNA fungieren als posttranskriptionalen Regulatoren, denn diese wirken sich auf die Geschwindigkeit der Translationsinitiation aus (Hall *et al.*, 1982; Wulff *et al.*, 1984). Die Bindungsstärke zwischen mRNA und Ribosom wird dabei um die Bindungsenergie der Sekundärstruktur vermindert (siehe Gleichung 1-1). Weil die Stabilität der Sekundärstrukturen von der Temperatur abhängt, ist diese für die Initiation der Translation und damit auch Regulation mitentscheidend.

Gleichung 1-1: $\Delta G_{\text{Gesamt}} = \Delta G_{\text{Bindung Ribosom-mRNA}} - \Delta G_{\text{Sekundärstruktur der mRNA}}$

In diesem Zusammenhang sind auch die kälteinduzierten CSP und RNA-Helikasen zu erwähnen, die an die mRNA binden und deren Struktur beeinflussen und damit die Initiation der Translation bei tiefen Temperaturen ermöglichen (siehe Abschnitt 1.2.1 und 1.2.2).

Auch die Halbwertszeit der mRNA-Moleküle in der Zelle ist temperaturabhängig und steigt bei sinkender Temperatur. Folglich steht die mRNA länger für die Translation zur Verfügung und mehr Protein wird gebildet. Ein Beispiel kältestabilisierter mRNA wurde im Fall des *bkdR*-Operons beschrieben (persönliche Kommunikation mit T. Schweder, Greifswald). Die Gene dieses Operons kodieren Proteine, die am Isoleucinkatabolismus beteiligt sind und damit Vorläufer für die Synthese verzweigtkettiger Fettsäurereste zur Kälteanpassung der Zellmembran zur Verfügung stellen (siehe Abschnitt 1.2.3).

Im Gegensatz zu anderen Stressarten wie z.B. Hitze, Salz und Ethanol wurden für den Kälteschock bislang keine Sigmafaktoren beschrieben, die bei der Regulation der Kälteschockantwort eine übergeordnete Rolle spielen. Allerdings spielt der allgemeine Stressfaktor σ^B bei längerem Wachstum von *B. subtilis* bei niedrigen Temperaturen eine Rolle (Hecker & Völker, 2001; Petersohn *et al.*, 2001; Brigulla *et al.*, 2003)..

Abschließend ist festzustellen, dass sich für die Kälteschockantwort neben vielen Einzelbeispielen für die Temperaturerfassung und Signalweiterleitung noch kein schlüssiges Gesamtbild der Regulation ergibt.

1.4 Die Kälteschockantwort in *Bacillus subtilis* JH642

In diesem Abschnitt wird eine Besonderheiten des in dieser Arbeit verwendeten Stammes *B. subtilis* JH642 mit Bezug auf die Kälteschockantwort beschrieben (siehe Abbildung 1.4-1).

Die von Isoleucin abgeleiteten α -Ketosauren dienen zur Synthese von verzweigtkettigen Fettsäureresten, die für die Erniedrigung des Schmelzpunktes der Zellmembran und damit deren Kälteanpassung sorgen (siehe Abschnitt 1.2.3). Da sowohl die verzweigtkettigen Fettsäurereste als auch die ungesättigten Fettsäurereste die Fluidität der Membran in der Kälte konstant halten können, ist es experimentell schwierig, beide Strategien unabhängig voneinander zu beobachten. Um beide Wege zu entkoppeln, kann der Stamm *B. subtilis* JH642 verwendet werden, da er einen uncharakterisierten Defekt in der Isoleucinbiosynthese hat (Klein *et al.*, 1999). Unter isoleucinfreien Wachstumsbedingungen kann JH642 seine Membran deshalb ausschließlich über die Synthese ungesättigter Fettsäurereste an die Kälte anpassen. Die Fettsäuredesaturase Des und das Zweikomponentensystem DesKR werden in JH642 unter isoleucinfreien Bedingungen essentiell und sind deshalb *in vivo* leicht zu charakterisieren.

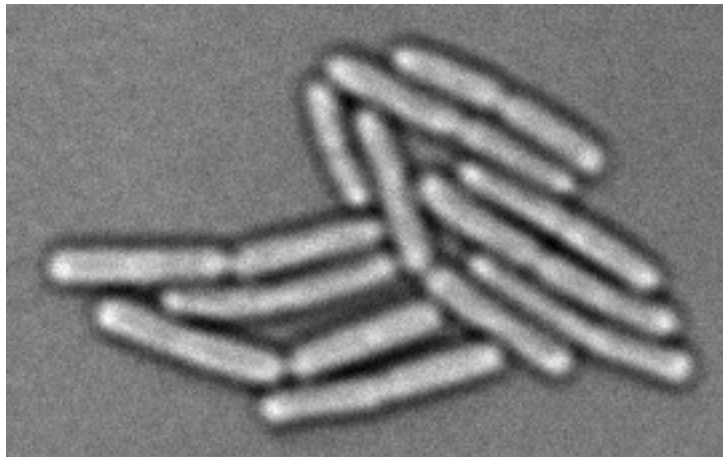


Abbildung 1.4-1 *Bacillus subtilis* JH642 im Lichtmikroskop

1.5 Aufgabenstellung

Mikroorganismen sind den ständig wechselnden Umweltbedingungen direkt ausgesetzt. Um ein optimiertes Wachstum oder auch nur Überleben zu gewährleisten, müssen die Mikroorganismen das komplexe Zusammenspiel ihrer Zellphysiologie fortwährend anpassen. Je nach Art der Umweltänderung sind andere Reaktionen der Zelle erforderlich, um sich auf die neuen Bedingungen einzustellen. Jeder Anpassungsreaktion geht die Erkennung der Umweltveränderung mit entsprechender Signalweiterleitung voraus, um die kritischen Systeme der Zelle neu zu regulieren. Für das umfassende Verständnis der Anpassungsreaktion eines Mikroorganismus sind also Kenntnisse über die Stresswahrnehmung und Signalweiterleitung notwendig. Im Zentrum des Interesses stehen die Regulation und Funktion der beteiligten Anpassungssysteme.

Aktuelle Techniken wie die Proteom- und Transkriptionsanalyse sollen in dieser Arbeit eingesetzt werden, um die Kälteschockantwort in *B. subtilis* systematisch zu untersuchen. *B. subtilis* gilt als Modellorganismus für Gram positive Mikroorganismen und der hohe Kenntnisstand über dieses Bakterium sowie die Sequenzierung dessen Chromosoms bieten eine optimale Voraussetzung für grundlegende Untersuchungen. Die Erkenntnisse aus den geplanten Experimenten mittels Zweidimensionaler Gelelektrophorese und DNA Arrays an kältegeschocktem *B. subtilis* JH642 sollen für die Entwicklung weiterführender Projekte über einzelne kältespezifische Regulations- und Anpassungssysteme genutzt werden. Dabei soll insbesondere die Regulation und Funktion von bislang uncharakterisierten kälteinduzierten Genen und Proteinen untersucht werden, um das derzeitige Bild der Kälteschockantwort von Mikroorganismen zu erweitern.

Darüber hinaus soll die Rolle von Zweikomponentensystemen für die Regulation von Kälteschockgenen im Allgemeinen und der Fettsäuredesaturase Des aus *B. subtilis* im Speziellen geklärt werden. Zu diesem Zweck sollen Deletionsmutanten von Zweikomponentensystemen erstellt und mittels genomweiter Transkriptionsanalyse bzw. Northernblotanalyse von kältegeschockten Zellen untersucht werden.

2 Material

2.1 Geräte

In dieser Arbeit wurden folgende Geräte eingesetzt:

Gerät	Hersteller	Typ
1D-PAGE	<i>Hoefer</i>	Mighty Small
2D-PAGE Kammer	<i>BioRad</i>	Protean Plus Dodeca Cell
2D-PAGE IEF	<i>Pharmacia</i>	Multiphor II
2D-PAGE Netzgerät	<i>BioRad</i>	PowerPac 3000
Analysenwaagen	<i>Sartorius</i>	
Autoklav	<i>Tuttnauer</i>	5075 ELV
Brutschrank	<i>Köttermann</i>	2736
Elektroporator	<i>Biorad</i>	Gene Pulser II
FPLC	<i>Pharmacia</i>	Äkta purifier Äkta prime
French Press	<i>Sim Aminco</i>	French Pressure Cell Press
Geltrockner	<i>Fisherbrand</i>	FSGD-5040
Kugelmühle	<i>B. Braun Biotech</i>	
Kühlfalle	<i>Uniequip</i>	Unicryo MC 2L -60°C
Kulturröller	<i>New Brunswick</i>	TC-7
Luftschüttler	<i>New Brunswick</i>	Series 25
Lyophilisator	<i>Edwards</i>	Freeze Dryer Super Modulyo
Netzgeräte	<i>GibcoBRL</i>	PS 305
PCR-Maschine	<i>Eppendorf</i> <i>Perkin Elmer</i>	Mastercycler Personal GeneAmp PCR-System, 9700
pH-Meter	<i>Schott</i>	CG 840
Phosphorimager	<i>Amersham Biotech</i>	Storm860 Fluorescence Imager
Pipetten	<i>Eppendorf</i>	Reference
Rotoren	<i>Sorvall</i>	SA-300, SS-34
Sequencer	<i>PE Applied</i> <i>Biosystems</i>	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
SpeedVac	<i>Eppendorf</i>	Concentrator 5301
Szintillationszähler	<i>Packard</i>	1900CA TRI-CARB Liquid Scintillation Analyzer
Thermoschüttler	<i>Eppendorf</i>	Thermomixer Comfort
Thermoschüttler	<i>Eppendorf</i>	Thermomixer Compact
Ultraschallsonde	<i>Bandelin</i>	electronik UW 200

UV/VIS-Spektrometer	<i>Pharmacia</i>	Ultrospec 3000
UV-Crosslinker	<i>Stratagene</i>	Stratalinker UV Crosslinker Model 1800
Vakuum Blot System	<i>Amersham Pharmacia</i>	VacuGene™XL
Vortexer	<i>Heidolph</i>	Reax Top
Wasserentionisator	<i>Seral</i>	Seralpur Pro 90 CN
Wasserschüttler	<i>Infors</i>	Aquatron Rundschüttelmaschine
Zentrifugen	<i>Haraeus Haraeus Haraeus Sorvall Sorvall</i>	Biofuge Pico Megafuge 1.0R Minifuge RF RC26 Plus RC5B Plus

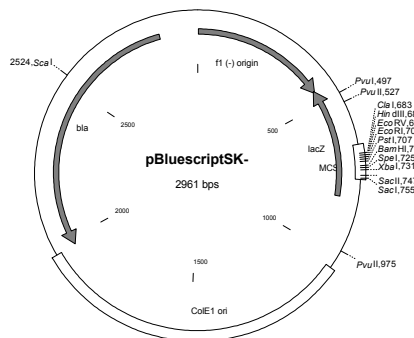
2.2 Enzyme, Chemikalien und Kits

Alle nachfolgend nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen *Merck* (Darmstadt), *Sigma* (Deisenhofen) oder *Aldrich* (Steinheim) bezogen.

Hersteller (Herkunft)	Produkt(e)
<i>ABI (Perkin Elmer)</i> (Weiterstadt)	dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit
<i>Amersham Pharmacia</i> (Freiburg)	Nylonmembran Hybond N ⁺ , Restriktionsendonukleasen, T4-DNA Ligase, X-Gal, IPTG, Proteinkinase K, Antibiotika, Lysozym, <i>IPG-Strips</i> , Carrier-Ampholyte, (O'Farrell)-Methionin
<i>Biomol</i> (Ilvesheim)	DTT, CHAPS [3-((3-Cholamidopropyl)-dimethylammino)-1-propane-sulfonate]
<i>Boehringer Mannheim</i> (Mannheim)	RNase A, DNase 1, Expand™ Long Template PCR System
<i>Difco</i> (Detroit, USA)	Hefeextrakt, Nutrient Broth, Casamino acids
<i>Eurogentec</i> (Belgien)	Agarose
<i>Fluka</i> (Neu-Ulm)	TMED, SDS, DEPC
<i>Kodak</i> (Rochester, USA)	Röntgenfilm Biomaxx MR
<i>Millipore</i> (Molsheim)	Sterilfilter (0,20 µm Porengröße), Whatman 3MM Filterpapier
<i>MWG Biotech</i> (Ebersberg)	synthetische Oligonukleotide (Primer)
<i>New England Biolabs</i> (Schwalbach)	Restriktionsendonukleasen, DNA- und Proteinmarker
<i>Oxoid</i> (Wesel)	Bactotrypton, Agar Nr. 1
<i>Qiagen</i> (Hilden)	tip 20/100-Anionenaustauschersäulen, QIAquick-spin PCR Purification Kit, Ni ²⁺ -NTA-Agarose
<i>Roth</i> (Karlsruhe)	Ethidiumbromid, Harnstoff, Glycin, Isopropanol
<i>Serva</i> (Heidelberg)	Acrylamid, Bisacrylamid, Ammoniumpersulfat

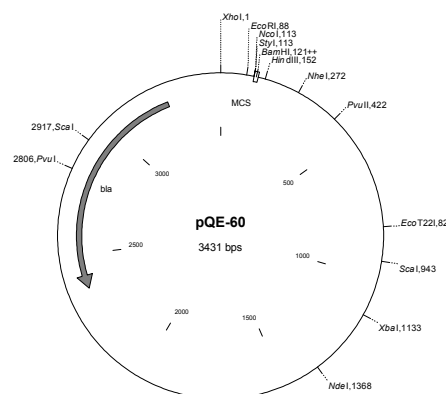
2.3 Vektoren

2.3.1 pBluescript



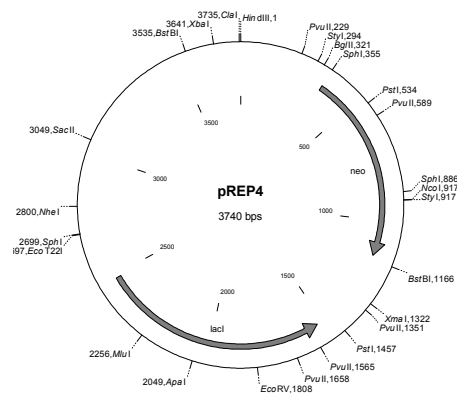
Der Phagemid Vektor pBluescript II SK(-) (*Stratagene*) kann zur Präparation von DNA herangezogen werden. Das pUC19 Derivat (Vieira & Messing, 1982) enthält das für die α -Komplementation erforderliche *lacZ'* Gen der β -Galactosidase, was die Blau/Weiß Selektion auf rekombinante Plasmide ermöglicht. Das β -Lactamasegen vermittelt Ampicillin Resistenz. Der Vektor enthält den Replikationsursprung für *E. coli* (ColE1) aus dem Plasmid pBR322 (Sutcliffe, 1979). In Anwesenheit eines Helferphagen kann vom Replikationsursprung des Bakteriophagen f1 (*f1 ori*) einzelsträngige DNA synthetisiert werden. Vor und hinter dem umfangreichen Polylinker sind die induzierbaren T3 oder T5 Promotoren lokalisiert.

2.3.2 pQE60/70/30



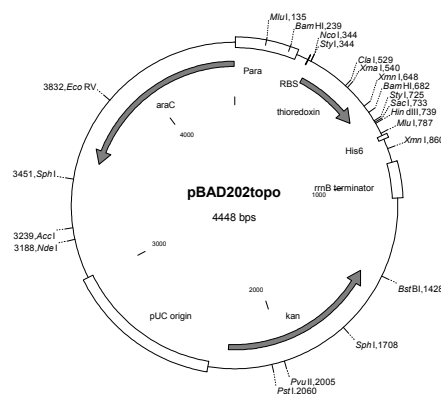
Die pQE Vektoren (Bujard *et al.*, 1987) wurden für die rekombinante Genexpression verwendet. Die Integration der DNA führt zur Fusion mit sechs C-terminalen Histidinkodons (His_6 -tag). Das Plasmid beinhaltet das β -Lactamasegen und den Replikationsursprung für *E. coli* aus pBR322 (Sutcliffe, 1979). Das Plasmid besitzt den *E. coli* Phagen T5-Promotor und zwei *lac* Operatorsequenzen. Die ribosomale Bindungsstelle ist synthetisch. Die MCS enthält drei Endonucleaseerkennungssequenzen, wobei das ATG Startcodon in eine *NcoI* (pQE60) bzw. *SphI* (pQE70) Erkennungssequenz integriert ist. Hinter dem Polylinker befindet sich die Kodierungssequenz des His_6 -tag gefolgt von Translationsstopcondons in allen drei Leserastern. Ergänzend besitzt das Plasmid den Transkriptionsterminator t_0 des λ -Phagen.

2.3.3 pREP4



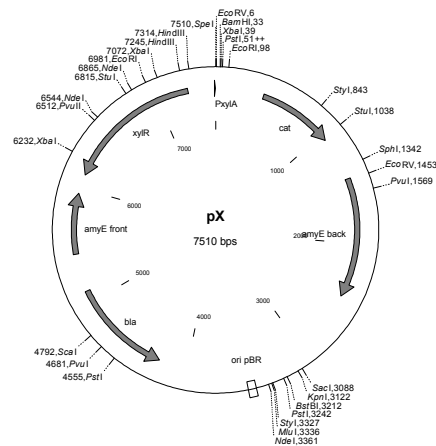
Das *lacI* Gen auf dem pREP4 Vektor gewährleistet eine hohe Repressorkonzentration zur Repression von pQE Vektoren (Farabaugh *et al.*, 1978). pREP4 vermittelt zudem Kanamycinresistenz (*neo* Gen). Durch eine Mutation in der RBS produziert pREP4 weniger Neo, so dass 25 µg/ml Kanamycin zur Selektion plasmidtragender Zellen ausreichen. pREP4 ist aufgrund seines Replikationsursprungs kompatibel zu allen Plasmiden, die einen ColE1-Ursprung tragen, wie z.B. pQE Vektoren (Abschnitt 2.3.2).

2.3.4 pBAD202



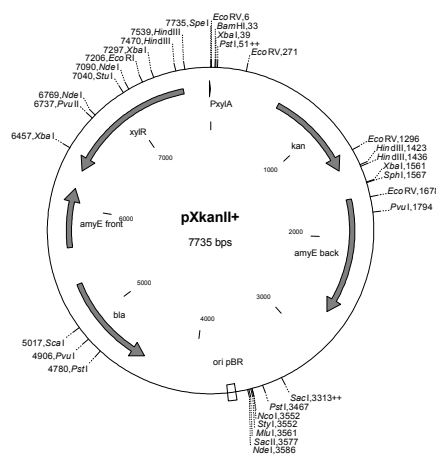
Der pBAD202/D-TOPO Vektor (*Invitrogen*) wurde für die rekombinante Genexpression verwendet. Die Integration der DNA (*pBAD Directional TOPO Expression Kit*) führt zur Fusion mit einer N-terminalen HP-Thioredoxin Domäne zur Verbesserung der Proteinlöslichkeit und einem C-terminalen His₆-tag für die effektive Proteinreinigung. Die Genexpression steht unter der Kontrolle des Arabinose induzierbaren *araBAD* Promotors, dessen Regulatorprotein AraC ebenfalls von dem Plasmid kodiert wird (Guzman *et al.*, 1995). Eine Erkennungsstelle für eine Enterokinase erlaubt das Abspalten der N-terminalen Domäne. Ein C-terminales V5 Epitop ermöglicht zusätzlich die Proteindetektion mit Anti-V5 Antikörpern (Southern *et al.*, 1991). Der pUC Replikationsursprung sorgt für die *low-copy* Replikation in *E. coli* auf die mit Kanamycin selektiert werden kann.

2.3.5 pX



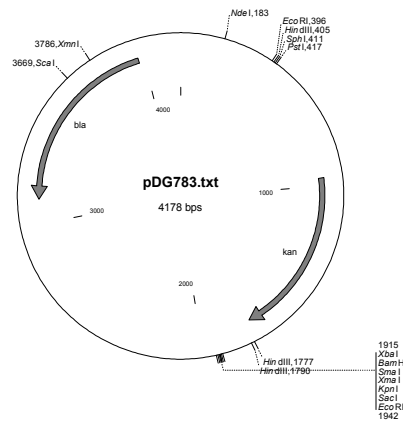
Der pX Vektor dient zur Integration von Genen in das *amyE* Gen von *B. subtilis* und deren kontrollierte Expression durch einen Xylose induzierbaren Promotor (Kim *et al.*, 1996). Dazu wurde zwischen die 5' und 3' Enden von *amyE* das Xyloserepressor codierende *xylR* Gen und der Promotor von *xylA* aus *Bacillus megaterium* positioniert. Ein Replikationsursprung für *E. coli* und das Ampicillinresistenz Gen *bla* aus pBR322 (Sutcliffe, 1979) ermöglichen die Klonierung und Selektion in *E. coli*.

2.3.6 pXkan



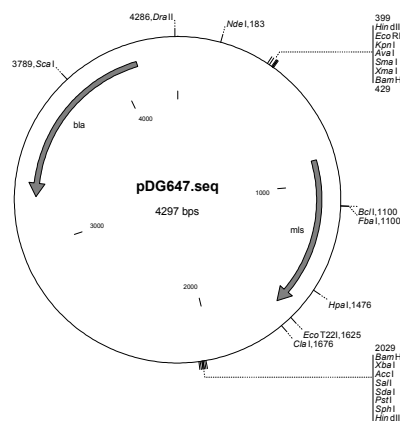
Der pXkan Vektor ist eine in dieser Arbeit erstellte Variante des pX Vektors (Abschnitt 2.3.5), bei dem die Chloramphenicolresistenz des pX Vektors gegen eine Kanamycinresistenz ausgetauscht wurde. Dieser Vektor erweitert die Selektionsmöglichkeiten für den Fall, dass die Chloramphenicolresistenz schon für andere genetische Manipulationen in *B. subtilis* verwendet wurde.

2.3.9 pDG783



Der pDG783 Vektor gehört zu einer Serie von Plasmiden, die unterschiedliche Resistenzkassetten für die Klonierung und Selektion in *B. subtilis* tragen (Guerout-Fleury *et al.*, 1995). Die von dem *bla* Gen kodierte β -Lactamase verleiht die Ampicillinresistenz zur Selektion des Plasmids in *E. coli*. Die zahlreichen Restriktionsschnittstellen vor und nach der Kanamycinkassette erlauben eine Vielzahl von Klonierungsmöglichkeiten des Resistenzgens für die Selektion auf Kanamycin in *B. subtilis*.

2.3.10 pDG647



Der pDG647 Vektor gehört zu einer Serie von Plasmiden, die unterschiedliche Resistenzkassetten für die Klonierung und Selektion in *B. subtilis* tragen (Guerout-Fleury *et al.*, 1995). Die von dem *bla* Gen kodierte β -Lactamase verleiht die Ampicillin Resistenz zur Selektion des Plasmids in *E. coli*. Die zahlreichen Restriktionsschnittstellen vor und nach der MLS-Kassette erlauben eine Vielzahl von Klonierungsmöglichkeiten des Resistenzgens für die Selektion auf Erythromycin und Lincomycin in *B. subtilis*.

2.4 Mikroorganismen

Stamm	Genotyp	Quelle(Literatur)
<i>Bacillus subtilis</i>		
JH642	<i>pheA1 sfp⁰ trpC2</i>	(Hoch & Mathews, 1973)
MO1099	JH642 <i>amyE::mls</i>	(Gonzy-Treboul <i>et al.</i> , 1992)
CB10	JH642 <i>desK::kan</i>	Diese Arbeit
CB15	JH642 <i>yplP::kan</i>	Diese Arbeit
CB16	JH642 <i>ylaG::kan</i>	Diese Arbeit
CB17	JH642 <i>yorG::kan</i>	Diese Arbeit
CB18	JH642 <i>ydeB::kan</i>	Diese Arbeit
CB19	JH642 <i>yhfH::kan</i>	Diese Arbeit
CB20	JH642 <i>ydjO::kan</i>	Diese Arbeit
CB21	JH642 <i>veg::kan</i>	Diese Arbeit
CB30	JH642 <i>ydbR::cat</i>	Diese Arbeit
CB40	JH642 <i>yqfR::mls</i>	Diese Arbeit
CB41	JH642 <i>amyE::xylR-P_{xylA}-yqfR-kan</i>	Diese Arbeit
CB3041	JH642 <i>ydbR::cat</i>	Diese Arbeit
	<i>amyE::xylR-P_{xylA}-yqfR-kan</i>	
CB4041	JH642 <i>yqfR::mls</i>	Diese Arbeit
	<i>amyE::xylR-P_{xylA}-yqfR-kan</i>	
CB3441	JH642 <i>ydbR::cat yqfR::mls</i>	Diese Arbeit
	<i>amyE::xylR-P_{xylA}-yqfR-kan</i>	
CB50	JH642 <i>ydbR-gfp</i>	Diese Arbeit
CB51	JH642 <i>yqfR-gfp</i>	Diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>		
M15	<i>ara gal lac mtl F⁻ Nal^S Str^S Rif^S</i>	Qiagen
BL21	<i>E. coli B F⁻ dcm ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) gal</i>	Stratagene
XL1 blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi⁻1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI^q ZΔM15 Tn10 (Tet^R)]</i>	Stratagene
Top10	<i>F' {lacI^q Tn10(Tet^R)} mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 D(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>	Invitrogen

Tabelle 2.4-1

2.5 Medien

Als Vollmedium für *E. coli* und *B. subtilis* wurden 2YT oder LB verwendet. Als Minimalmedium für *B. subtilis* diente SMM. Als Sporulationsmedium für *B. subtilis* wurde Difco Sporulationsmedium (DSM) verwendet. Sterilfiltrierte Bestandteile der Medien wurden erst nach dem Autoklavieren zugegeben, um Präzipitate zu vermeiden.

2YT	16	g/L	Trypton	
	10	g/L	Hefeextrakt	
	5	g/L	NaCl	
LB	10	g/L	Trypton	
	5	g/L	Hefeextrakt	
	10	g/L	NaCl	
DSM	8	g/L	Nutrient Broth	
	1	g/L	KCl	
	0,12	g/L	MgSO ₄	
	0,6	g/L	NaOH, 1M	
	3	mL/L	Spurenelemente I	(sterilfiltriert)
SMM	100	mL/L	10x SMM	
	10	mL/L	Glukose, 50% (w/v)	(sterilfiltriert)
	10	mL/L	Spurenelemente II	(sterilfiltriert)
10x SMM	20	g/L	(NH ₄) ₂ SO ₃	
	140	g/L	K ₂ HPO ₄	
	60	g/L	KH ₂ PO ₄	
	10	g/L	Trinatriumzitat·2H ₂ O	
	2	g/L	MgSO ₄ ·7H ₂ O	
Spurenelemente I	1	M	CaNO ₃	
	10	mM	MnCl ₂	
	1	mM	FeSO ₄	
Spurenelemente II	0,55	g/L	CaCl ₂	
	1,35	g/L	FeCl ₂ ·6H ₂ O	
	0,1	g/L	MnCl ₂ ·4H ₂ O	
	0,17	g/L	ZnCl ₂	
	0,43	g/L	CuCl ₂ ·2H ₂ O	
	0,06	g/L	CoCl ₂ ·6H ₂ O	
	0,06	g/L	Na ₂ Mo ₄ ·2H ₂ O	

Tabelle 2.5-1

2.6 Medienzusätze

Zur Herstellung fester Nährmedien, wurden die Flüssigmedien vor dem Autoklavieren mit 1,2% Agar versetzt. Bei Bakterienstämmen mit Aminosäureauxotrophien wurde auf die Zugabe entsprechender Aminosäuren geachtet.

	Endkonzentration		Stammlösung		Stammlsg./Medium	
<i>B. subtilis</i> JH642						
L-Tryptophan	50	µg/mL	5	mg/mL	10	µL/mL
L-Phenylalanin	50	µg/mL	5	mg/mL	10	µL/mL
L-Isoleucin	50	µg/mL	10	mg/mL	5	µL/mL

Tabelle 2.6-1

2.7 Antibiotika

Hitzeempfindliche Antibiotika wurden nach Abkühlung der Medien auf 50-60°C sterilfiltriert zugegeben. Dabei variierte die Konzentration abhängig von den verwendeten Bakterien und auch von den verwendeten Resistenzkassetten. Hier sind deshalb nur die gebräuchlichsten Konzentrationen angegeben, Abweichungen davon sind im Text angegeben.

	Endkonzentration		Stammlösung		Stammlsg./Medium	
<i>E. coli</i>						
Ampicillin	50-100	µg/mL	5	mg/mL	20	µL/mL
Kanamycin	25	µg/mL	10	mg/mL	2,5	µL/mL
<i>B. subtilis</i>						
Kanamycin	10	µg/mL	10	mg/mL	1	µL/mL
Chloramphenicol	5	µg/mL	34	mg/mL	0,147	µL/mL
Spectinomycin	100	µg/mL	25	mg/mL	4	µL/mL
Erythromycin	1	µg/mL	4	mg/mL	0,25	µL/mL
Lincomycin	25	µg/mL	10	mg/mL	2,5	µL/mL
Phleomycin	5	µg/mL	3	mg/mL	1,7	µL/mL

Tabelle 2.7-1

3 Methoden

3.1 Präparation chromosomaler DNA

Die Präparation von chromosomaler DNA aus *E. coli* und *B. subtilis* erfolgte über die Bindung an Anionentauschersäulen. Zuerst wurde im Fall von Gram positiven Bakterien die Zellwand mit Lysozym hydrolysiert. Danach erfolgte Lyse der Protoplasten mit Detergentien. Das Zellysate wurde auf Anionentauschersäulen aufgetragen, die daran gebundene DNA mit Puffern gewaschen und durch Erhöhung der Salzkonzentration wieder eluiert. Das Zellpellet einer Übernachtskultur (2 mL) wurden in B1 (1 mL) resuspendiert, mit Lysozym (20 µL, 100 mg/mL) und Proteinase K (45 µL, 20 mg/mL) vermischt und im Heizblock inkubiert (30 min, 37°C). Durch Zugabe von Puffer B2 (350 µL) lysierten die Protoplasten. Die klare und viskose Lösung wurde weiter inkubiert (15 min, 37°C). Das erhaltene Lysat wurde mit einem Volumen QBT-Puffer versetzt und zur partiellen Scherung der chromosomalen DNA vortexiert (15 sec) und auf eine mit QBT-Puffer (4 mL) äquilibrierte Anionentauschersäule (*tip-20, Qiagen*) aufgetragen. Die Säule wurde zweimal mit QC-Puffer (2 mL) gewaschen und die chromosomale DNA anschließend mit QF-Puffer (2 mL) eluiert. Die chromosomale DNA wurde durch Zugabe von Isopropanol (0,7 Volumen) gefällt und zentrifugiert (30 min, 13.000 upm). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Es wurde darauf geachtet die DNA nicht zu übertrocknen. Die DNA wurde schließlich in EB-Puffer (200 µL) aufgenommen und gelöst.

B1	50	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	50	mM	EDTA
	100	µg/mL	RNaseA
	0,5	% (v/v)	Tween TM 20
	0,5	% (v/v)	Triton X-100
B2	3	M	Guanidinhydrochlorid
	20	% (v/v)	Tween TM 20
QBT	750	mM	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 7,0
	15	% (v/v)	Ethanol
	0,15	% (v/v)	Triton X-100
QC	1	M	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 7,0
	15	% (v/v)	Ethanol
QF	1,25	M	NaCl
	50	mM	MOPS, pH 8,2
	15	% (v/v)	Ethanol

EB-Puffer	10	mM	Tris/HCl, pH 8,5
------------------	----	----	------------------

3.2 Plasmidpräparation

Zur Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde eine modifizierte Methode der alkalischen Zellwandlyse angewandt (Birnboim & Doly, 1979). Bei der nachfolgenden Neutralisation mit Natriumacetat fallen die chromosomale DNA und Proteine aus. Die im Überstand verbleibenden Plasmide können mit Isopropanol gefällt werden. Das Zellpellet einer Übernachtskultur (2 mL) wurde mit Puffer P1 (300 µL) resuspendiert und durch Mischen mit Puffer P2 (300 µL) lysiert. Die klare viskose Lösung wurde mit Puffer P3 (300 µL) neutralisiert und nach Inkubation auf Eis (5 min) abzentrifugiert (13000 upm, RT). Der Überstand wurde in ein 1,5 mL Reaktionsgefäß überführt, mit Isopropanol (0,7 Volumen = 680 µL) vermischt und zentrifugiert (30 min, 4°C). Das Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen und im Heizblock bei 37°C oder in der Speed-Vac getrocknet. Das Pellet wurde in EB-Puffer (40 µL) aufgenommen und zum Lösen im Heizblock inkubiert.

P1	50	mM	Tris/HCl, pH 8,0
	10	mM	EDTA
	100	µg/mL	RNaseA
P2	200	mM	NaOH
	1	% (v/v)	SDS
P3	2,55	M	KAc
EB-Puffer	10	mM	Tris/HCl, pH 8,0

3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Hitzestabile DNA-Polymerasen werden in der Polymerasekettenreaktion ((Mullis & Faloona, 1987)) verwendet, um mit Hilfe von synthetischen Oligonucleotiden (Primer) und Matrizen-DNA (Templat) ein DNA-Fragment zu amplifizieren. Die Reaktion erfolgt in drei sich wiederholenden Schritten, nämlich die Denaturierung der Templat-DNA, die Hybridisierung der Primer mit der Templat-DNA (*Annealing*) und ausgehend von den Primern die 5'-3' Polymerisation der neuen DNA. Für die Reaktion stehen eine Reihe von kommerziellen Polymerasen zur Auswahl, die sich in Geschwindigkeit und Ablesegenauigkeit unterscheiden. In den meisten Fällen wurde das *ExpandTM Long Template PCR-Kit* nach Angaben des Herstellers verwendet, der ein Gemisch aus *Taq*- und *Pwo*-DNA-Polymerase enthält. Zur Bestimmung der Polymerisationszeit wurde eine Reaktions-

geschwindigkeit von 1000 Basen in 40 sec angenommen. Die Annealingtemperatur T_A der Primer wurde durch folgende Formel berechnet:

$$T_A (^{\circ}\text{C}) = 69,3 + \frac{0,41 (\text{GC-Gehalt})}{\text{Primerlänge}} - \frac{650}{\text{Primerlänge}}$$

Gleichung 3-1

Besaßen die Primer nichtkomplementäre 5'-Enden (zur Einführung von Restriktionschnittstellen), so wurde die Annealingtemperatur in den ersten fünf bis zehn Zyklen der Reaktion erniedrigt. Das Schema einer PCR-Reaktion ist im Folgenden dargestellt.

Reaktionsprotokoll PCR

5 Zyklen	Denaturierung	94°C	10 sec
	Annealing	ca. 45-55°C	15 sec
	Polymerisation	68°C	40 sec/kb
25 Zyklen	Denaturierung	94°C	10 sec
	Annealing	ca. 50-60°C	15 sec
	Polymerisation	68°C	40 sec/kb
<hr/>			
20 µL PCR-Ansatz	14	µL	PCR-Mix 3
	2	µL	Templat-DNA (Plasmid-DNA 1:100 verdünnt chromosomale DNA 1:10 verdünnt)
	2	µL	5' Primer (5 pmol/µL)
	2	µL	3' Primer (5 pmol/µL)
<hr/>			
PCR-Mix 3	512	µL	dH ₂ O
	75	µL	dNTP-Mix
	75	µL	Puffer 3 (<i>ExpandTM Long Template PCR-Kit</i>)
	7,5	µL	DNA-Pol.-Mix (<i>ExpandTM Long Template PCR-Kit</i>)
<hr/>			
dNTP-Mix	2	µL	100 mM dATP
	2	µL	100 mM dCTP
	2	µL	100 mM dGTP
	2	µL	100 mM dTTP
	<i>ad.</i> 100	µL	dH ₂ O

3.4 DNA-Präparation aus PCR-Ansätzen

Die Aufreinigung von PCR-Ansätzen erfolgte entweder über Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.7) mit nachfolgender Gelextraktion oder bei sehr spezifischen PCR-Reaktionen direkt mit dem *QIAquick Spin PCR Purification Kit* (*Qiagen*). Dabei wird die DNA durch die wasserentziehende Wirkung hoher Konzentrationen chaotroper Salze (ClO_4^- , GuHCl) auf einer Silicageloberfläche präzipitiert. Ethanolische Waschlösungen reinigen die DNA, bevor sie mit EB-Puffer rehydratisiert und eluiert wird. Die Zusammensetzungen der Puffer werden vom Hersteller nicht angegeben.

Der PCR-Ansatz wurde mit Puffer PB (fünf Volumen) versetzt und auf die Quick-Spin-Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation (13000 upm, 1 min) wurde die Säule mit Puffer PE (750 µL) befüllt und zentrifugiert (13000 upm, 1 min). Es wurde ein weiteres mal Zentrifugiert (13000 upm, 1 min), um Restflüssigkeit weitgehend zu entfernen und anschließend mit offenem Deckel im Heizblock getrocknet (37°C, 15 min). Die DNA wurde mit 40 µL Puffer EB inkubiert (37°C, 5 min) und in ein neues 1,5 mL Reaktionsgefäß eluiert (13000 upm, 1 min). Die Menge an DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt.

3.5 Hydrolytische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die hydrolytische Spaltung von doppelsträngiger DNA erfolgte mit Restriktionsendonukleasen vom Typ II. Diese Enzyme erkennen eine palindrome Tetra- oder Hexanukleotidsequenz, innerhalb der sie die DNA hydrolytisch spalten. Dabei entstehen je nach Enzym glatte Enden („*blunt ends*“) oder 3′ bzw. 5′ überhängende Enden („*sticky ends*“). Das 5′-Ende trägt nach der Spaltung immer die Phosphatgruppe, das 3′-Ende die freie Hydroxylgruppe. Ein typischer Reaktionsansatz, bei dem Enzyme und Puffersysteme der Firma *NEB* verwendet wurden, hatte folgende Zusammensetzung.

50 µL Verdau	5-10 µL	gereinigte PCR oder Plasmid-DNA
	5 µL	10x Reaktionspuffer (<i>NEB</i>)
	1 µL	Restriktionsenzym (U/µL) (<i>NEB</i>)
<i>ad. 100</i>	µL	dH ₂ O

1 µg DNA wird bei 37°C von 1 U Enzym in 3 h vollständig verdaut. Wurde DNA mit zwei Enzymen gleichzeitig verdaut, waren die Pufferbedingungen auf beide Enzyme abgestimmt. Anschließend wurde die DNA entweder mit dem *QIAquick Spin PCR Purification Kit* (*Qiagen*) oder über Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.7) mit nachfolgender Gelextraktion gereinigt. Für analytische Verdaue, z.B. zur Kontrolle von Plasmiden, wurden 2 µL Plasmidlösung mit 0,2 µL Enzym in 20 µL verdaut und davon 10 µL auf ein Agarosegel aufgetragen.

3.6 Dephosphorylierung von 5′-Phosphatgruppen

Zur Erhöhung der Ausbeute rekombinanter Plasmide war es in einigen Fällen notwendig die 5′-Phosphatgruppe der Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase zu eliminieren. Die entstandene Hydroxylgruppe verhindert eine Religation von Vektor-DNA ohne Insert. Es standen CIP (*Calf Intestine Phosphatase*) und SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) zur Verfügung. Beide Enzyme lagen als „*low concentration enzyme*“ (1 U/µL) vor und konnten

wegen der hohen Salzverträglichkeit ohne Pufferwechsel am Ende eines Restriktionsverdaus (siehe Abschnitt 3.5) zugegeben werden. Die Reaktion wurde inkubiert (37°C, 20 min), längere Inkubationszeiten führten zu einer deutlichen Abnahme an Transformanten.

3.7 Agarosegelelektrophorese

Bei der Auftrennung von DNA-Fragmenten in horizontalen Agarosegelen in einem elektrischen Feld ist die gelaufene Wegstrecke der DNA proportional zum Logarithmus ihrer Länge. Durch Agarosegelelektrophorese wurden DNA-Fragmente zu analytischen oder präparativen Zwecken in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt. Für das Gel wurde der Tris/Borat-Laufpuffer (TB-Laufpuffer) mit Agarose (0,8% (w/v)) versetzt und aufgeköcht. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 15 µL/L (v/v)) zugegeben und die Lösung in eine horizontale Gelkammer gegossen, in die ein 18 zähliger Kamm zur Ausbildung der Auftragstaschen eingesetzt wurde. Das Gel wurde nach Erstarren mit TB-Laufpuffer überschichtet. Die DNA-Proben wurden 6x DNA-Probenpuffer gemischt und in die Probestaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 100 mA durchgeführt. Die DNA konnte durch Fluoreszenz des DNA-Ethidiumbromid-Komplexes im UV-Licht sichtbar gemacht werden. Dabei interkaliert Ethidiumbromid zwischen GC-Paaren der DNA und bildet einen Komplex, der unter UV-Licht (305 nm) im orangeroten Bereich des sichtbaren Lichts (590 nm) emittiert.

10x TB-Laufpuffer	109	g/L	Tris/HCl
	55,6	g/L	B(OH) ₃
6x DNA-Probenpuffer	25	%	Ficoll 400
	0,25	%	Bromphenolblau
	0,25	%	Xylenxynalol

3.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation dient zur Verknüpfung von DNA-Fragmenten, in der Regel ein mit Restriktionsendonukleasen (siehe Abschnitt 3.5) geschnittenes Plasmid und ein ebenso geschnittenes Insert. Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 5'-Phosphat- und den 3'-Hydroxylgruppen doppelsträngiger DNA. Dabei wurde für einen Ligationsansatz ein Überschuss an Insert im Vergleich zum Plasmid verwendet (mindestens 3:1). Die Konzentration der verwendeten DNA wurde zuvor über Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.7) abgeschätzt. Der

Ligationsansatz wurde entweder über Nacht bei 16°C oder 1-3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Ein typischer Ligationsansatz hat folgende Zusammensetzung.

Ligationsansatz	1	µL	T4 DNA Ligase
	1	µL	10xT4 DNA Ligase-Puffer
	1-2	µL	Plasmid-DNA
	3-7	µL	Insert
	ad. 10	µL	dH ₂ O

3.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von doppelsträngiger DNA wurde photometrisch bestimmt. Dazu wurde die Extinktion einer 1:100 Verdünnung der DNA-Lösung in H₂O bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Konzentration wurde nach folgender Formel berechnet:

$$c_{(\text{dsDNA})}(\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260}(1:100) \times 50 (\mu\text{g/mL})$$

3.10 Vorbereitung von RbCl₂ kompetenten *E. coli* Zellen

Bei *E. coli* kann der zeitlich begrenzte Zustand der Kompetenz durch die Behandlung mit Calciumchlorid oder Rubidiumchlorid induziert werden ((Dagert & Ehrlich, 1979)). Zur Herstellung kompetenter *E. coli* M15 pREP4 Zellen mit Rubidiumchlorid wurden 200 mL LB Medium (Kan²⁵) mit einer Vorkultur (1/100) inokuliert und bis zu einer Zelldichte von OD₆₀₀ = 0,4-0,5 herangezüchtet (250 upm, 37°C). Die Suspension wurde zentrifugiert (4000 upm, 5 min, 4°C) und die Zellpellets in eiskaltem TFB1-Puffer (jeweils 15 ml) suspendiert und auf Eis gestellt (90 min). Nach erneuter Zentrifugation (4000 upm, 5 min, 4°C) wurden die Zellen vorsichtig in eiskaltem TFB2-Puffer suspendiert und als Aliquots (400 µL) in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

TFB1 Puffer	100	mM	RbCl ₂
	50	mM	MnCl ₂
	30	mM	Kaliumacetat/HCl, pH 5,8
	10	mM	CaCl ₂
	15	% (w/v)	Glycerin,
TFB2 Puffer	10	mM	RbCl ₂
	75	mM	CaCl ₂
	10	mM	MOPS, pH 8,0
	15	% (w/v)	Glycerin,

3.11 Transformation von RbCl₂ kompetenten *E. coli* Zellen

Ligationsansätze wurden mit 100 µL kompetenten Zellen versetzt und auf Eis inkubiert (45 min). Nachfolgend wurde die Suspension einem Hitzeschock ausgesetzt (120 sec, 42°C) und sofort wieder auf Eis gestellt (120 sec). Der Hitzeschock bewirkt die Aufnahme der

extrachromosomalen DNA durch die Zellwand. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 0,5 mL LB Medium inkubiert (30 min, 37°C). Die Suspension wurde zentrifugiert (10000 upm, 15 sec), mit 50 µL des Überstandes suspendiert und auf Agarplatten mit der entsprechenden Antibiotika-Resistenz ausplattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurden die Kolonien auf frische Platten umgestrichen, um Satellitenkolonien zu vermeiden. Zur Retransformation von intakten Plasmiden genügten 20 µL kompetente Zellen. Die Zellsuspension wurde vor dem Ausplattieren nicht zentrifugiert, sondern 50-100 µL direkt ausplattiert. So wurde meist eine Kolonienzahl von 200 pro Platte erreicht.

3.12 Vorbereitung von *E. coli* Zellen zur Elektrotransformation

Zur Präparation elektrokompenter *E. coli* Zellen wurden 400 mL LB Medium mit 4 mL einer *E. coli* TOP10 Übernachtskultur angeimpft. Die Kultur wurde bei 250 upm und 37°C bis zu einer OD₆₀₀ ~ 0,6 inkubiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte auf Eis. Die Kultur wurde in acht 50 mL Falcon-Röhrchen aufgeteilt und durch Zentrifugation pelletiert (5.000 upm, 10 min, 4°C). Die Pellets wurden zweimal mit je 40 mL eiskaltem dH₂O resuspendiert und erneut zentrifugiert (5.000 upm, 10 min, 4°C). Die acht Pellets wurden anschließend in ca. 8 mL eiskaltem dH₂O vereinigt und in 2 mL Reaktionsgefäßen pelletiert (13.000 upm, 5 min, 4°C). Die Pellets wurden in insgesamt 100 µL 10% Glycerin aufgenommen. Die dickflüssige Zellsuspension wurde in 1,5 mL Eppendorfreaktionsgefäßen à 40 µL aliquotiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.13 Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation

Bei der Elektrotransformation werden die *E. coli*-Zellen zwischen den Platten eines Kondensators einem starken elektrischen Feld ausgesetzt. Die DNA dringt dabei durch die Membran in die Zelle. Die sterilen Küvetten (*Eurogentec*) wurden auf Eis vorgekühlt und mit einem Aliquot vorbereiteter *E. coli*-Zellen (siehe Abschnitt 3.12) und 1 µL des Ligationsansatzes (Abschnitt 3.8) versetzt. Alternativ wurde der komplette Ligationsansatz von 10 µL verwendet, der dann allerdings vorher 30 min gegen dH₂O dialysiert werden mußte, um die Probe zu entsalzen. Die Transformationen wurden bei einer Spannung von 2500 V und einer elektrischen Feldstärke von 12,5 kV/cm durchgeführt. Am „Pulse-Controller“ wurden 200 µs eingestellt. Nach der Elektroporation wurden das Gemisch in 1 mL vorgewärmten LB-Medium aufgenommen und eine Stunde bei 37°C inkubiert und auf antibiotikahaltigen Agarplatten ausplattiert. Durch die Inkubation über Nacht bei 37°C im Brutschrank wurde auf resistente Zellen selektiert.

3.14 Transformation kompetenter *B. subtilis*-Zellen

Bacillus subtilis wird beim Übergang vom exponentiellen Wachstum zur stationären Phase auf natürliche Weise kompetent. Die doppelsträngige DNA wird an die Zellmembran gebunden und nach Degradierung durch membrangebundene Nukleasen als Einzelstrang in die Zelle aufgenommen. Gemäß der Zweistufenmethode (Klein *et al.*, 1992) wurde der zu transformierende *B. subtilis* Stamm auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit Kolonien von dieser Platte wurde eine 3 mL Kultur in HS-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. 20 mL vorgewärmtes LS-Medium wurden mit 0,5 mL der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀~0,6 inkubiert (100 upm, 30°C). Dann wurde 1 mL dieser Kultur in ein steriles 2 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, welches die zu transformierende DNA enthielt. Das Reaktionsgefäß wurde für 2 h inkubiert (250 upm, 37°C). Der Transformationsansatz wurde auf DSM-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikazusatz ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

10x S-Base	20	g/L	Ammoniumsulfat
	140	g/L	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O
	60	g/L	KH ₂ PO ₄
	10	g/L	Trinatriumzitat
	1	mL/L	1 M MgSO ₄ (steril filitriert)
HS-Medium	10	mL	10x S-Base
	1	mL	50% (w/v) Glukose
	1	mL	10% (w/v) Hefeextrakt
	1	mL	2% (w/v) Caseinhydrolysat
	10	mL	8% (w/v) Arginin; 0,4% (w/v) Histidin
	1	mL	0,5% (w/v) Tryptophan
	1,5	mL	0,3% (w/v) Phenylalanin
	ad. 100	mL	dH ₂ O

Die Lösung wurde steril filitriert.

LS-Medium	2	mL	10x S-Base
	200	µL	50% (w/v) Glukose
	200	µL	10% (w/v) Hefeextrakt
	200	µL	50 mM Spermin
	100	µL	2% (w/v) Caseinhydrolysat
	50	µL	1 M MgCl ₂
	20	µL	0,5% (w/v) Tryptophan
	30	µL	0,3% (w/v) Phenylalanin
	ad. 20	mL	dH ₂ O

Die Lösung wurde direkt vor Gebrauch angesetzt und steril filitriert.

3.15 DNA-Sequenzierung

Zum Sequenzieren von DNA wurde die Kettenabbruchmethode nach Sanger verwendet (Sanger *et al.*, 1977). Mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Didesoxynukleotide (ddNTPs) markieren dabei den neusynthetisierten DNA-Strang. Durch Verwendung von vier verschiedenen Rhodaminfarbstoffen (für jede Base einer), die bei verschiedenen Wellenlängen emittieren, kann die Sequenzreaktion unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase in einem Ansatz durchgeführt werden. Nach Auftrennung der DNA-Fragmente durch Kapillarelektrophorese wurden diese durch einen Laserstrahl angeregt. Die Messung der Fluoreszenzmaxima ergibt direkt die Basenabfolge.

Protokoll für Sequenzierreaktion

1 Zyklus	Denaturierung	96°C	60 sec
30 Zyklen	Denaturierung	96°C	10 sec
	Annealing	T _{hyb} °C	5 sec
	Polymerisation	68°C	4 min
1 Zyklus	Polymerisation	68°C	5 min
		4 °C	∞

Sequenzieransatz	100	ng/kb	DNA-Matritze
	10	pmol	Sequenzierprimer
	3	µL	Terminatormix
	ad. 10	µL	dH ₂ O

Der Reaktionsansatz wurde nach dem *Cycling*-Schritt mit 1 µL 3 M NaOAc und 25 µL 100% Ethanol vermischt. Nach Zentrifugation (13.000 upm, 15 min, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 200 µL 70% Ethanol gewaschen und getrocknet (30 min, 37°C). Das Pellet wurde in 40 µL dH₂O resuspendiert (30 min, 50°C). Der Ansatz wurde nach Vorschrift des Herstellers (*ABI*) sequenziert. Die Elektropherogramme wurden mit dem Programm Sequencing Analysis (*ABI*) ausgewertet.

3.16 PCR-Generierung von DNA Fragmenten für Gendeletionen

Diese Methode beruht auf der PCR-Generierung eines DNA-Fragmentes bestehend aus einem Resistenzgen umgeben von den flankierenden Bereichen des zu deletierenden Gens. In Anlehnung an die von Kuwayama *et al.* beschriebene Methode (Kuwayama *et al.*, 2002) wurde zunächst mit den Primern P1 und P2 ein etwa 1000 bp großes *upstream*- und mit den Primern P3 und P4 ein etwa 1000 bp großes *downstream* gelegenes Fragment des Zielgens aus chromosomaler DNA amplifiziert (*ExpandTM Long Template PCR-Kit*, Boehringer Mannheim). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend mit den Primerpaaren P1/P2 und P3/P4 mit der *proof-reading* Polymerase *Pfx* (*GibcoBRL*) erneut amplifiziert. Dabei

entstehen PCR-Produkte ohne A-Überhang, anders als bei Amplifikation durch die Taq-Polymerase. Die Primer P2 und P3 enthielten an ihrem 5'-Ende eine zur verwendeten Resistenzkassette komplementäre Sequenz. Diese erlaubten es in einer „Produkt-PCR“ die *up*- und *downstream* Fragmente mit der Resistenzkassette zu verbinden. Dafür durchlief der Reaktionsansatz mit allen drei DNA Fragmente erst einige Zyklen alleine. Schließlich wurden die Primer P1 und P4 zu dem Ansatz pipettiert, um das in den ersten Zyklen gebildete Endprodukt aus den zusammengefügteten drei DNA-Fragmenten in dem Reaktionsgemisch zu vervielfältigen. Eine typische PCR zur Amplifikation aus chromosomaler DNA wurde wie beschrieben durchgeführt (Abschnitt 3.3).

Eine PCR mit Pfx-Polymerase wurde wie folgt durchgeführt:

1 Zyklus	Denaturierung	96°C	60 sec
5 Zyklen	Denaturierung	96°C	30 sec
	Annealing	T _{niedrig} °C	30 sec
	Polymerisation	68°C	60 sec/kb
30 Zyklen	Denaturierung	96°C	30 sec
	Annealing	T _{hoch} °C	30 sec
	Polymerisation	68°C	60 sec/kb
1 Zyklus	Polymerisation	68°C	5 min
		4 °C	∞

PCR mit Pfx	2	μL	DNA-Matrize aus <i>Taq/Pwo</i> -PCR
	2	μL	5'-Primer (5 pmol/μL)
	2	μL	3'-Primer (5 pmol/μL)
	5	μL	10x <i>reaction buffer</i>
	5	μL	10x <i>enhance buffer</i>
	7,5	μL	je 2 mM dNTP (A,T,G,C)
	1	μL	50 mM MgSO ₄
	0,5	μL	DMSO
	24,5	μL	dH ₂ O
	0,5	μL	Pfx Polymerase

Eine typische „Produkt-PCR“ wurde wie folgt durchgeführt:

1 Zyklus	Denaturierung	96°C	120 sec
10 Zyklen	Denaturierung	96°C	15 sec
	Annealing	T _{niedrig} °C	30 sec
	Polymerisation	68°C	Zeit1 (<i>up</i> +Res. bzw. Res.+ <i>dn</i>)
Pause	Zugabe von P1 und P4		
10 Zyklen	Denaturierung	96°C	15 sec
	Annealing	T _{niedrig} °C	30 sec
	Polymerisation	68°C	Zeit2 (<i>up</i> +Res.+ <i>dn</i>)
	Denaturierung	96°C	15 sec

10 Zyklen	Annealing	$T_{hoch}^{\circ C}$	30 sec
	Polymerisation	68°C	Zeit2 (<i>up</i> +Res.+ <i>dn</i>)
1 Zyklus	Polymerisation	68°C	5 min
		4 °C	∞

„Produkt-PCR“	44	μL	PCR-Mix 3 (Abschnitt 3.3)
	2	μL	PCR <i>upstream</i> -Fragment
	2	μL	PCR <i>downstream</i> -Fragment
	2	μL	Resistenzkassette
	2	μL	P1 (5 pmol/μL)
	2	μL	P4 (5 pmol/μL)

3.17 Arbeiten mit RNA

Ein Tropfen RNA-Lösung wird auf der menschlichen Haut in wenigen Sekunden vollständig degradiert. Deshalb müssen für das Arbeiten mit RNA alle Geräte und Lösungen frei von RNase sein. Das erreicht man durch Erhitzen oder den Einsatz von RNase-Inhibitoren. Alle Lösungen wurden mit DEPC-Wasser angesetzt und autoklaviert. Die verwendeten Pipetten wurden mit *RNAZap* (*Ambion Inc.*) besprüht und abgewischt. Leere Glasgefäße können durch Erhitzen von RNasen befreit werden.

DEPC-Wasser	1	mL	DEPC (Diethylpyrocarbonat)
	<i>ad.</i> 1000	mL	dH ₂ O

Lösung über Nacht stehen lassen und anschließend autoklavieren.

3.17.1 Zellkultivierung und Probenentnahme für RNA Präparation

Die Kulturen für die Präparation von gesamt-RNA wurden unter unterschiedlichen Bedingungen herangezogen, um vergleichende Analysen der RNA zu ermöglichen. Für eine Wachstumsbedingung wurden je Stamm zwei bis vier parallele Kulturen unabhängig voneinander gezogen. Dabei war die schnelle Probenentnahme und -aufbereitung wichtig, um den Abbau der RNA zu verhindern.

Für ein Kälteschockexperiment wurde folgende Prozedur eingehalten. Von einer frischen Platte wurden 3 mL SMM-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert (220 upm, 37°C). Mit der Vorkultur wurden 200 mL vorgewärmtes SMM Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert und im Wasserschüttler inkubiert (220 upm, 37°C). Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden 30 mL Probe entnommen, die 15 OD₆₀₀ Zellen entsprechen ($V[\text{mL}] = 15/\text{OD}_{600}$). Die verbliebende Kultur wurde sofort in einen 15°C kalten Wasserschüttler gestellt und dort weiter geschüttelt (220 upm, 15°C). Nach 70 min Kälteschock wurden erneut 30 mL Probe entnommen (wieder etwa 15 OD₆₀₀ Zellen, da sich die OD₆₀₀ bei 15°C nach 70 min kaum geändert hat). Die entnommenen Proben wurden in Falcon-Tubes pipettiert in denen zuvor

20 mL *Killing-Mix* schräg eingefroren wurde (um ein rasches Abkühlen der Probe zu erreichen) und anschließend zentrifugiert (5000 upm, 15 min, 4°C). Das Pellet wurde in 1 mL 4°C kaltem *Killing-Mix* resuspendiert, in ein 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (13.000 upm, 5 min, 4°C). Dieses wurde sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

<i>Killing-Mix</i>	20	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	5	mM	MgCl ₂
	200	mM	NaN ₃

3.17.2 Zellaufschluß für RNA Präparation

Für den Zellaufschluß wurde eine Kugelmühle verwendet, die es ermöglicht mit gefrorenen Proben zu arbeiten. Ein Zellpellet von 15 OD₆₀₀ (Abschnitt 3.17.1) wurde in 200 µL *Killing-Mix* resuspendiert und in das mit flüssigen Stickstoff gefüllte Probengefäß der Kugelmühle pipettiert. Das Probengefäß wurde verschraubt, an der Kugelmühle befestigt und geschüttelt (2600°upm, 2 min). Das Zellmehl wurde in 4 mL auf 50°C vorgewärmten Lyse-Puffer aufgenommen, auf vier 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäße aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Lyse-Puffer	2,08	mL	Natriumacetat, pH 5,2 (Endkonz. 0,025 M)
	118,16	g	Guanidinthiocyanat (Endkonz. 4 M)
	12,5	mL	10% N-Lauroylsarcosinat (Endkonz. 0,5%)
	ad. 250	mL	dH ₂ O

3.17.3 RNA-Extraktion mit der „Saure Phenol“-Methode

Bei der Behandlung von Zelllysats mit saurem Phenol gelangt die DNA in die organische Phase, die RNA verbleibt in der wässrigen Phase und kann weiter aufgereinigt werden (Majumdar *et al.*, 1991).

Das noch gefrorene Zelllysats wurde mit einem Volumen (1 mL) saurer Phenol-Lösung versetzt und im Eppendorf-Mixer geschüttelt (5 min, RT) und zentrifugiert (12000 upm, 5 min, RT). Von dem Überstand wurden nur 850 µL abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, um Verunreinigung mit DNA aus der Interphase zu vermeiden. Es wurde erneut mit einem Volumen (850 µL) saurer Phenol-Lösung versetzt und nach Schütteln im Eppendorf-Mixer (5 min, RT) zentrifugiert (12000 upm, 5 min, RT). Von dem Überstand wurden nur 700 µL in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es wurde mit einem Volumen Chloroform/IAA (700 µL) versetzt und nach Schütteln im Eppendorf-Mixer (5 min, RT) zentrifugiert (12000 upm, 5 min, RT). Schließlich wurde dieser Überstand in ein neues

Reaktionsgefäß überführt, nacheinander mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat, pH 5,2 (70 µL) und 1 mL Isopropanol vermischt und die RNA über Nacht bei -20°C präzipitiert.

Die RNA wurde abzentrifugiert (15000 upm, 15 min, 4°C) der Überstand verworfen und das Pellet mit eiskaltem 70% Ethanol (1 mL) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das RNA-Pellet in der Speed-Vac getrocknet (1 min!). Schließlich wurde die RNA in dH_2O gelöst.

Saure Phenol-Lösung	50	mL	Aqua-Phenol (Roth)
	48	mL	Chloroform
	2	mL	Isoamylalkohol
Lösung zweimal mit sterilem DEPC-Wasser ausschütteln.			

Chloroform/IAA	96	mL	Chloroform
	4	mL	Isoamylalkohol
Lösung mit Tris/HCl, pH 8,0 äquilibrieren.			

3.18 Northernblotanalyse

Der Northernblot dient zur Transkriptionsanalyse eines Gens, dabei wird die Größe und Menge einer spezifischen mRNA-Menge unter bestimmten Kultivierungsbedingungen ermittelt (Serrano *et al.*, 2001). Die zuvor präparierte mRNA (Abschnitt 3.17.3) wird denaturiert, über ein Gel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und über eine Genspezifische digoxigeninmarkierte RNA-Sonde detektiert.

3.18.1 Erstellen einer digoxigeninmarkierten RNA Sonde

Zur Herstellung der Sonde wurde ein etwa 600 bp langes internes PCR Fragment des zu untersuchenden Gens amplifiziert, wobei der 3'-Primer zusätzlich die Sequenz des T7 RNA Polymerase Promotors enthielt. Ausgehend von dem Amplifikat mit T7 Promotor wurde durch *run-off* Transkription mit dem T7-RNA-Polymerase Kit (*Ambion Incorporated*) die *antisense* orientierte RNA erstellt. Die eingesetzten Nukleotide waren mit Digoxigenin gekoppelt um die spätere Detektion der Sonde zu ermöglichen.

3.18.2 Gießen von Agarosegelen zur RNA Trennung

Die zu untersuchende mRNA wurde zunächst durch Agarosegelelektrophorese nach ihrer Größe getrennt. Das Agarosegel wurde in eine Gelkammer mit Kamm gegossen und 1 h abkühlen gelassen. Das Formaldehyd im Gel verhindert die Bildung von Sekundärstrukturen der RNA.

Agarosegel für RNA	6	g	Agarose
	292	mL	DEPC H ₂ O (autoklaviert)
	40	mL	10x MOPS-Puffer
	68	mL	35% Formaldehyd
mischen, aufkochen, auf 60°C abkühlen			
10x MOPS-Puffer (DEPC H ₂ O)	0,2	M	MOPS/NaOH, pH 7,0
	50	mM	Natriumacetat
	10	mM	EDTA

3.18.3 Probenvorbereitung von RNA für Agarosegele

Während sich das Agarosegel verfestigt, wurden die RNA-Proben mit Probenpuffer (1 Volumen) versetzt, denaturiert (10 min, 68°C), auf Eis abgeschreckt und sofort auf das Gel aufgetragen. Das Gel lief bei 120 V etwa 3-3,5 h.

Probenpuffer	6,5	mL	Formamid
	1,2	mL	Formaldehyd
	2	mL	10x MOPS-Puffer
	0,4	mL	50% Sucrose
	20	mg	Bromphenolblau
	20	mg	Xylenyanol

3.18.4 Aufbereitung von RNA Agarosegelen

Während das Agarosegel läuft wurde die Blotapparatur mit der Nylonmembran aufgebaut. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel auf die Blot-Apparatur gelegt und für 5 min mit 50 mM NaOH zur partiellen Hydrolyse der RNA übergossen. Die Natronlauge wurde abgesaugt und das Gel für 5 min mit 10 mM NaCl Lösung übergossen. Das Gel wurde anschließend mit 20xSSC Puffer übergossen und 1,5-2 h mittels Vakuum auf die Membran geblottet. Anschließend wurden auf der Membran die Taschen des Gels mit Kugelschreiber markiert und die RNA durch zweimaliges UV-crosslinking (*“StrataLinker”, Stratagene*) auf der Membran fixiert.

20xSSC Puffer	88,2	g	Na-Zitrat/HCl, pH 7,0
	175,3	g	NaCl
	ad. 1000	mL	DEPC H ₂ O

3.18.5 RNA-Hybridisierung und Waschen

Die Membran wurde in verschraubten Glasröhren mit Hybridisierungslösung prähybridisiert (1h, 68°C). Am Ende dieser Stunde wurde die Sonde denaturiert (95°C, 10 min), die Hybridisierungslösung abgegossen und die Sonde in 20 mL frischer Hybridisierungslösung auf die Membran gegossen und über Nacht geschwenkt (68°C). Die

Lösung wurde abgegossen und die Sonde konnte bei -20°C bis zur Wiederverwendung gelagert werden. Anschließend wurde die Membran nach folgendem Protokoll gewaschen:

Waschen	50-100	mL	2xSSC; 0,1% SDS	5	min
	50-100	mL	2xSSC; 0,1% SDS	5	min
	50-100	mL	0,2xSSC; 0,1% SDS	15	min
	50-100	mL	0,2xSSC; 0,1% SDS	15	min
	50-100	mL	Puffer 1	1	min
	50	mL	Puffer 2	30	min
	40	mL	Puffer 2 mit 4 µL Antikörper-Konjugat (1:10.000 Verdünnung)	30	min
	50-100	mL	Puffer 1	15	min
	50-100	mL	Puffer 1	15	min

Hybridisierungslösung	100	mL	Formamid
	50	mL	20x SSC
	4	g	<i>Blocking reagent</i> (bei 50°C lösen)
	2	mL	10% N-Lauroylsarkosin
	14	g	SDS
	ad. 200	mL	DEPC H ₂ O

nicht autoklavieren, bei 4°C lagern

Puffer 1	116,1	g	Maleinsäure/NaOH (fest), pH 7,5
	87,66	g	NaCl
	ad. 1000	mL	DEPC H ₂ O

Lösung wird erst bei pH 7 klar

Puffer 2	450	mL	Puffer 1
	50	mL	10% <i>Blocking reagent</i>

Blocking reagent	10	g	<i>Blocking reagent</i>
	ad. 100	mL	Puffer 2

bei 50°C eine Stunde rühren, danach autoklavieren (Lösung wird nicht klar)

3.18.6 Detektion

Die Membran wurde nach dem Waschen kurz in 0,1 M Tris/HCl pH 9,5 geschwenkt und abtropfen gelassen. Auf die Glasplatte des Phosphoimagers (*Storm860*, *Amersham-Pharmacia*) wurde das Substrat pipettiert, mit der Membran belegt und mit Folie abgedeckt. Die Umsetzung des Substrates durch den an die RNA gebundenen, mit alkalischer Phosphatase markierten Antikörper führt zu einem fluoreszierenden Produkt, welches durch den Laser des Phosphoimagers angeregt wird. Das emittierte Licht wird gemessen und mit dem Programm *Image Quant* (*Molecular Dynamics*) quantifiziert.

3.19 Transkriptionsanalyse von *B. subtilis* mit Mikroarrays

Die Transkriptionsanalyse von *B. subtilis* mit Mikroarrays ist eine vergleichende Methode. Dabei wird die Menge der jeweils vorhandenen mRNA-Moleküle aus zwei unterschiedlichen Zellkulturen miteinander verglichen. Dazu wird erst die gesamte RNA aus den zwei zu vergleichenden Proben isoliert. Diese wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben und radioaktiv markiert. Die markierte cDNA wird mit 4107 spezifischen Oligonukleotidprimern, die komplementär zu den 3'Enden der mRNA von *B. subtilis* sind, hybridisiert. Die Signale auf der Hybridisierungsmembran werden anschließend mit einem Phosphoimager detektiert und die Daten mit entsprechender Software am Rechner ausgewertet. Aus den Daten erhält man die relative Transkription der 4107 *orf's* in den zu vergleichenden Zellkulturen.

3.19.1 Isolation der gesamten RNA aus *B. subtilis*

Die Isolation der RNA aus *B. subtilis* wurde wie unter 3.17.3 beschrieben durchgeführt.

3.19.2 Reverse Transkription und Markierung

Bei der Reversen Transkription wird die aus *B. subtilis* isolierte mRNA (Abschnitt 3.19.1) in cDNA umgeschrieben. Dies geschieht mit Hilfe der SuperscriptII Polymerase und einem Oligonukleotidprimergemisch (*Sigma-Genosys*). Die 4107 spezifischen Primer sind komplementär zu den 3'Enden der mRNA von *B. subtilis*. Für die spätere Detektion ist ein Teil des für die Synthese der cDNA eingesetzten dCTP's durch ^{33}P radioaktiv markiert. Es wurde nach dem folgenden Protokoll vorgegangen.

Reverse Transkription	2	µg	RNA
	3	µL	5x hybridisation buffer
	4	µL	primer set (<i>Sigma-Genosys</i>)
	ad. 15	µL	dH ₂ O
2 min bei 95°C inkubieren und kurz anzentrifugieren			
60 min bei 42°C inkubieren und kurz anzentrifugieren			
	6	µL	5x superscript buffer
	3	µL	100 mM DTT
	0,75	µL	Nukleotidmix (10 mM AGT; 0,1 mM C)
	5	µL	^{33}P -dCTP
	2	µL	SuperscriptII Polymerase
60 min bei 43°C inkubieren und kurz anzentrifugieren			
15 min bei 70°C inkubieren und kurz anzentrifugieren			
	1	µL	10% SDS
	1	µL	0,5 M SDS
	3	µL	3 M NaOH
30 min bei 65°C inkubieren und kurz anzentrifugieren			
	10	µL	1 M Tris/HCl pH 8,0

	3	μL	2 M HCl
	5	μL	<i>carrier</i> tRNA
	5	μL	3 M NaAc pH 5,2
0,5 μL entnehmen und Aktivität bestimmen			
	60	μL	Isopropanol
präzipitieren und 2 mal mit 150 μL 70% Ethanol waschen			
in 60 μL dH ₂ O resuspendieren			
0,5 μL entnehmen und Aktivität bestimmen			

Aus den beiden Aktivitätsbestimmungen kann die Inkorporationsrate von ³³P-dCTP errechnet werden. Sie sollte mindestens 50% betragen.

3.19.3 Hybridisierung der cDNA

Die Hybridisierung wurde wie schon für den Northern Blot beschrieben durchgeführt (Abschnitt 3.18.5).

3.19.4 Detektion der Mikroarray-Signale

Für die Detektion wurden die Membranen glatt auf Karton gelegt und mit Folie luftblasenfrei eingewickelt. Eventuell vorhandene Luftblasen wurden mit einem weichen Papier ausgewischt. Dabei ist zu beachten, dass die Membran nie ganz trocken werden darf. Die Membranen wurden auf Phosphorscreen-Kassetten (*Amersham-Pharmacia*) zwischen 4 h und 12 h aufgelegt, die Zeit ist abhängig von der Strahlung auf der Membran und der Qualität des Lasers im Phosphoimager. Die Phosphorscreens wurden nach der Exposition mit einem Phosphoimager (*Storm860*, *Amersham-Pharmacia*) ausgelesen und für die Wiederverwendung mit weissem Licht gelöscht.

3.19.5 Auswertung der Mikroarraydaten

Die Bilddaten vom Auslesen der Phosphorscreens (Abschnitt 3.19.4) wurden mit der Software *ArrayVision* (Version 6.0, *Imaging Research, Inc.*) erfasst, normiert und quantifiziert. Abweichungen zwischen den parallelen Experimenten wurden manuell überprüft und gegebenenfalls korrigiert, wenn die Ursache für die Abweichung z.B. Luftblasen bei der Hybridisierung waren, die als solche auf dem Abbild der Membran zu erkennen sind. Die eingehende Analyse der Daten wurde mit der Software *Gene-Spring* (Version 4.2, *Silicon Genetics*) vorgenommen. Unter Berücksichtigung aller parallelen Experimente wurden mit *Gene-Spring* die relativen Transkriptionsraten bzw. mRNA Mengen bestimmt. Dabei wurde nach dem Vergleich unabhängiger Proben gleicher Kultivierungsbedingungen angenommen, dass 2-fach höhere bzw. niedrigere mRNA Mengen als signifikante Änderung gelten können.

3.20 Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine

Nach Klonierung des Zielgens in einen geeigneten Expressionsvektor (Abschnitt 3.20.1 und 3.20.2) unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors erfolgte die Produktion des Proteins in *E. coli*. Die Produktion wurde durch SDS-PAGE (Abschnitt 3.21) nachgewiesen. Die Aufreinigung der His₆-tag Fusionsproteine erfolgte durch Affinitätschromatographie mit Ni²⁺-NTA Agarosesäulen (Abschnitt 3.20.4).

3.20.1 Genexpression in pQE Vektoren

Die pQE Vektoren (Abschnitt 2.3.2) ermöglichen die Überproduktion von Fusionsproteinen mit N-terminalem (pQE30) bzw. C-terminalem (pQE60/70) His₆-tag unter Kontrolle des *lac*-Promotors. Zur Expression wurden die *E. coli* Stämme M15 oder BL21 mit dem rekombinanten Plasmid transformiert. Das Plasmid pREP4 kodiert für den Lac Repressor und konnte deshalb zusätzlich für eine noch striktere Kontrolle der Expression verwendet werden.

300 ml vorgewärmtes LB Medium wurden mit 1/100 (v/v) einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen wurden in einem Schüttler inkubiert (250 upm, 25°C) inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 wurde die Genexpression durch Zugabe von IPTG (0,5 mM) induziert und für 2-3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 upm, 10 min, 4°C).

3.20.2 Genexpression in pBAD-Vektoren

Der pBAD202 Vektor (Abschnitt 2.3.4) ermöglicht die Überproduktion von Fusionsproteinen mit N-terminalem Thioredoxin zur Verbesserung der Proteinlöslichkeit und C-terminalem His₆-tag für die Proteinreinigung unter Kontrolle des *ara*-Promotors. Zur Expression wurden die *E. coli* Stämme M15 oder BL21 mit dem rekombinanten Plasmid transformiert.

300 mL vorgewärmtes LB Medium wurden mit 1/100 (v/v) einer Übernachtskultur angeimpft. Die Kulturen wurden in einem Schüttler inkubiert (250 upm, 25°C) inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,7-0,8 wurde die Genexpression durch Zugabe von 0,001% (w/v) Arabinose induziert und für 2-3 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (5000 upm, 10 min, 4°C).

3.20.3 Zellaufschluss mit der French Press

Die mit Aufschlusspuffer (5 mL/400 mL Kultur) resuspendierten Zellen wurden mit Hilfe einer French-Press (*Sim Aminco*) aufgeschlossen. Hierbei werden die Zellen zunächst einem

sehr hohem Druck ausgesetzt, der nach Durchfließen einer kleinen Öffnung schlagartig nachlässt. Durch die resultierenden Scherkräfte werden die Zellwände zerrissen und der Zellinhalt freigesetzt. Um die Proteine zu schonen, wurde die gesamte Behandlung bei 4°C durchgeführt. Nach dem Aufschluss wurde die erhaltene Suspension durch Zentrifugation (17000 upm, 30 min, 4°C) von Zelltrümmern und unlöslichen Bestandteilen getrennt und der klare gelbliche Überstand sofort weiter gereinigt (Abschnitt 3.20.4).

Aufschlusspuffer*	20	mM	Hepes/KOH, pH 7,4
	300	mM	NaCl

*Der Grundpuffer variierten in Konzentration und Zusätzen.

3.20.4 Affinitätschromatographie von His₆-tag Proteinen

IMAC (Immobilized Metal ffinity Chromatography) wurde erstmals 1975 für die Proteinaufreinigung beschrieben (Porath *et al.*, 1975). NTA-Liganden binden als vierzählige Chelate Ni²⁺-Ionen fest an die Gelmatrix. Die beiden freien Koordinationsstellen des Nickels können von den Histidinen des His₆-tag besetzt werden und ermöglichen so eine spezifische Bindung des rekombinanten Proteins an die Gelmatrix. Die Elution des Proteins erfolgt durch Protonierung der Histidine bei einer pH-Wert Senkung auf 5 oder durch kompetitives Verdrängen mit Imidazol. Geringe Imidazolkonzentrationen im Auftragspuffer verringern eine unspezifische Bindung von Proteinen.

Zur Aufreinigung der His₆-tag Proteine wurde das FPLC System *Äkta purifier* oder *Äkta prime* (Amersham/Pharmacia) mit einer HR5/10 Säule (Pharmacia) mit Ni²⁺-NTA Agarose (etwa 1 mL) verwendet. Nach Äquilibrieren mit Proteinpuffer wurde die Säule mit dem Zellrohextrakt mit einer Flussrate von 0,5 mL/min beladen und mit einer Flussrate von 1 mL/min gewaschen. Proteine wurde durch Messung der UV-Absorbtion bei 280 nm detektiert. Nachdem der Großteil der zellulären Proteine die Gelmatrix passiert hatte, wurden spezifisch gebundene Proteine durch einen linear steigenden Imidazolgradienten eluiert und im Fraktionssammler aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden mit SDS-PAGE (Abschnitt 3.21) untersucht und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Methode (Abschnitt 3.22.4) quantifiziert.

Proteinpuffer*	20	mM	Hepes/KOH, pH 7,4
	300	mM	NaCl

Elutionspuffer*	20	mM	Hepes/KOH, pH 7,4
	300	mM	NaCl
	250	mM	Imidazol

*Die Grundpuffersysteme variierten in Konzentration und Zusätzen.

3.21 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli diente zur qualitativen Proteinanalyse und zur Reinheitskontrolle der aufgereinigten Proteine (Laemmli, 1970). Bei dieser Methode lagern sich stöchiometrisch zwei SDS-Moleküle pro Aminosäure eines Proteins an. Durch die Anlagerung werden die Proteine denaturiert und in eine negativ geladene SDS-Micelle eingebettet. Das Maskieren der Proteineigenladung durch die negative Gesamtladung der SDS-Moleküle und die Proportionalität zwischen Proteinkettenlänge Ladung ermöglicht eine effektive Auftrennung eines Proteingemisches durch Wanderung der negativ geladenen SDS-micellierten Proteine zur Anode. Das Sammelgel besaß einen pH-Wert von 6,8 und das Trenngel pH 8,8. Zum Gießen der Gele fanden die angegebenen Lösungen Verwendung, die Zusammensetzung variierte allerdings je nach gewünschtem Vernetzungsgrad der Gele. Angegeben ist die Zusammensetzung für ein 5% Sammel- und ein 10% Trenngel. Diese Kombination ist zur Auftrennung von Proteinen der Größen 50 kDa bis 120 kDa geeignet und konnte somit für den überwiegenden Teil der hergestellten Proteine benutzt werden. Als Elektrophoresekammern wurden *mighty small*-Vertikalkammern (*Hoefer Scientific*) benutzt. Die zur Elektrophorese verwendeten Stromstärken lagen bei 10 mA/Gel (Auftragen), 20 mA/Gel (Sammelgel) und 40 mA/Gel (Trenngel). Um im Proteingel den beobachteten Banden ein Molekulargewicht zuordnen zu können, wurde stets ein Größenstandard mit aufgetragen. Diese 10 kDa Proteinleiter (*Gibco BRL*) zeigt zwölf Banden von 10-120 kDa, sowie zusätzlich eine Bande bei 200 kDa.

Acrylamid-Lösung	30	%(w/v)	Acrylamid
	0,8	%(w/v)	N-N'-Methylenbisacrylamid

Angaben für 2 Gele:

Sammelgel (5%)	1,25	mL	1,5 M Tris/HCl, pH 6,8
	0,83	mL	Acrylamid-Lösung
	100	µL	10% SDS
	2,84	mL	dH ₂ O
	10	µL	TEMED
	50	µL	10% APS
Trenngel (10%)	2,5	mL	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
	3,33	mL	Acrylamid-Lösung
	100	µL	10% SDS
	4	mL	dH ₂ O
	10	µL	TEMED
	50	µL	10% APS
SDS-Laufpuffer	25	mM	Tris

192	mM	Glycin
7	mM	SDS

3.21.1 Probenvorbereitung für SDS-PAGE

Zellpellets aus 1 mL Kulturlösung wurden in TE-Puffer (75 µL) und 4xProbenpuffer (25 µL) resuspendiert und erhitzt (10 min, 95°C), was zur Lyse der Zellen und zur Denaturierung der freigesetzten Proteine führte. Bei Proteinlösungen wurden 3 Teile Probenlösung mit 1 Teil 4xProbenpuffer versetzt und ebenfalls erhitzt (10 min, 95°C). Im Probenpuffer enthaltenes β -Mercaptoethanol führte zur Spaltung aller Disulfidbrücken zwischen Cysteinen. Anschließend wurde zentrifugiert (13000 upm, 5 min). Die Menge der auf das SDS-Gel aufzutragenen Proben wurde nach dem OD₆₀₀-Wert der Zellkulturen zum Zeitpunkt der Probenentnahme berechnet (von 1 mL Probe der OD₆₀₀ = 1 wurden 10 µL des resuspendierten Pellets aufgetragen).

4xProbenpuffer	50	mM	Tris/HCl, pH 6,8
	8	%(w/v)	SDS
	40	%(v/v)	Glycerin
	20	%(v/v)	β -Mercaptoethanol
	5	mg/L	Bromphenolblau

3.21.2 Proteinanfärbung in Polyacrylamidgelen

Die Proteine wurden nach erfolgter Elektrophorese mit der Coomassie-Färbemethode sichtbar gemacht (Bennett & Scott, 1971). Dazu wurde *Coomassie Brilliant Blue R250* als Farbstoff benutzt. Das Gel wurde in der Färbe-Lösung in der Mikrowelle kurz zum aufkochen gebracht und noch 10 min geschüttelt. Durch wiederholten Austausch gegen neue Entfärbelösung wurde das Gel entfärbt, bis die Proteine sichtbar wurden.

Färbe-Lösung	500	mL	Ethanol
	100	mL	Essigsäure
	250	mg	<i>Coomassie Brilliant Blue R250</i>
	ad. 1	L	dH ₂ O
Entfärbe-Lösung	200	mL	Ethanol
	100	mL	Essigsäure
	ad. 1	L	dH ₂ O

3.22 Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2D-PAGE)

Unter zweidimensionaler Gelelektrophorese (2D-PAGE) versteht man ganz allgemein die Kombination zweier beliebiger elektrophoretischer Trennmethoden. Inzwischen hat sich die Nacheinanderschaltung von denaturierender Isoelektrischer Fokussierung (IEF) und SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) bewährt (O'Farrell, 1975). Durch die

Trennung eines Proteingemisches nach pI und Größe ergibt sich ein zweidimensionales Protein-Pattern, das für den untersuchten Organismus und die Kulturbedingungen charakteristisch ist. Mit den 2D-Gelen lassen sich insbesondere die Auswirkungen verschiedener Kulturbedingungen oder von Mutationen auf die Proteinsynthese untersuchen. Die Arbeitsschritte unterscheiden sich bei Coomassie/Silber-Gelen und ^{35}S -markierten Gelen, beide Methoden werden nacheinander beschrieben.

3.22.1 Zellkultivierung und Probenentnahme für Coomassie/Silber 2D-Gele

Für ein Kälteschockexperiment wurde folgende Prozedur eingehalten. Von einer frischen Platte wurden 3 mL SMM-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert (220 upm, 37°C). Mit der Vorkultur wurden 200 mL vorgewärmtes SMM Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert und im Wasserschüttler inkubiert (220 upm, 37°C). Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden 2x50 mL Probe in ein Falcon-Tube überführt und zentrifugiert (5000 upm, 10 min, 4°C). Die verbleibenden 100 mL Kultur wurden sofort in einen 15°C kalten Wasserschüttler gestellt und dort weiter inkubiert (220 upm, 15°C). Nach 70 min Kälteschock wurden erneut 2x50 mL Probe entnommen und zentrifugiert (220 upm, 15°C). Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abgegossen die zwei Zellpellets mit H₂O (1 mL, 4°C) resuspendiert, in einem 1,5 mL Halbmikroreaktionsgefäß vereinigt und noch zweimal mit eiskaltem dH₂O (1 mL) gewaschen (2x Resuspendieren+Pelletieren). Die so erhaltenen Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

3.22.2 Zellaufschluss von Proben für Coomassie/Silber 2D-Gele

Die Proben wurden mit 800 µL Resuspensionspuffer resuspendiert und auf Eis gelagert. Der Aufschluss erfolgte mittels Ultraschall für 5x für 30 sec, bei einer Einstellung von 25-30 % Leistung des Spannungsgerätes, und einem Arbeitsintervall von 80%. Zwischen den Beschallungsintervallen erfolgten 30 sec Pausen auf Eis, um die Lösung abzukühlen. Die Zelltrümmer wurden zwei Mal hintereinander abzentrifugiert (13.000 upm, 10 min, 4°C) und der Überstand in ein neues Halbmikroreaktionsgefäß pipettiert.

Resuspensionspuffer	10	mM	Tris/HCl, pH 7,4
	1	mg/mL	MgCl ₂ ·6H ₂ O
	100	µg/mL	RNase A (100 U/mg)
	100	µg/mL	DNase 1 (100 U/mg)
	24,3	mg	PMSF (in 200 µL EtOH)

3.22.3 Gefriertrocknung von Proben für Coomassie/Silber 2D-Gele

Zunächst wurden die aufgeschlossenen Proben zwecks Ankonzentrierung lyophilisiert (gefriergetrocknet). Die Proteinextrakte wurden in einem 1,5 mL Halbmikroreaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend das Gefäß mit einem Stück Aluminiumfolie abgedeckt, so dass ein Druckausgleich möglich ist, die Proteine aber im Verlauf der Lyophilisation nicht verloren gehen. Die Probe wurde über Nacht lyophilisiert bis die Proteine vollständig trocken waren. Das Lyophilisat wurde anschließend bei -20°C gelagert.

3.22.4 Quantifizierung von Proben für Coomassie/Silber 2D-Gele

Für Coomassie/Silber-Gele wurden 400 μg bzw. 100 μg Protein pro Gel verwendet. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Anfärben mit *Coomassie Brilliant Blue* G-250 (Bradford, 1976). Durch die Bindung von *Coomassie Brilliant Blue* G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm nach 595 nm. Die resultierende Absorption bei 595 nm ist proportional zur Proteinkonzentration. Bei der Konzentrationsbestimmung wurde darauf geachtet den linearen Messbereich des Photometers nicht zu überschreiten ($\text{OD}_{600} < 0,8$). Für die Bestimmung nach Bradford wurden zunächst die lyophilisierten Proben in der kleinstmöglichen Menge an EB-Puffer (üblicherweise 200 μL) aufgenommen. 5 μL der Proteinlösung wurden mit dH_2O auf 1 mL aufgefüllt und davon 100 μL mit 900 μL Bradford-Lösung vermischt und für 10 min inkubiert. Als Referenz diente ein Gemisch aus 100 μL dH_2O mit 900 μL Bradford-Lösung. Zur Erstellung einer Kalibriergeraden dienten BSA-Standards mit Konzentrationen von 10, 20, 40, 60, 80 und 100 μg BSA/mL, der lineare Messbereich war bis 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gegeben.

Bradford-Lösung	50	mL	Ethanol
	100	mL	85% H_3PO_4
	100	mg	<i>Coomassie Brilliant Blue</i> G-250

3.22.5 Zellkultivierung und Probenentnahme für „pulse-chase“ markierte ^{35}S -Gele

Für ein Kälteschockexperiment wurde folgende Prozedur eingehalten. Von einer frischen Platte wurden 3 mL SMM-Medium angeimpft und über Nacht inkubiert (220 upm, 37°C). Mit der Vorkultur wurden 30 mL vorgewärmtes SMM Medium auf eine OD_{600} von 0,05 inokuliert und im Wasserschüttler inkubiert (220 upm, 37°C). Bei einer OD_{600} von 0,5 wurden je 4 mL der Kultur in zwei vortemperierte 10 mL Erlenmeyerkolben pipettiert. Die eine 4 mL Kultur schüttelte weiter bei 37°C die zweite bei der Kälteschocktemperatur von 15°C . Die 4 mL 37°C Kultur wurde sofort nach dem Transfer unter ständigem Schütteln mit ^{35}S -Methionin

(60 μCi) versetzt („pulse“) und für zehn Minuten geschüttelt (220 upm, 0-10 min, 37°C). Die 4 mL 15°C Kultur wurde erst 30 min nach dem Transfer unter ständigem Schütteln mit ^{35}S -Methionin (60 μCi) versetzt („pulse“) und für 60 min weiter geschüttelt (220 upm, 30-90 min, 15°C).

Das ^{35}S -Methionin wurde unverdünnt aus dem Gefäß des Herstellers entnommen, da die Verdünnung mit dH_2O in einem vorangegangenen Experiment zu einer schlechteren Aufnahme des Methionins führte. Eine mögliche Erklärung für dieser Beobachtung ist die schlechte Löslichkeit des Methionins in Wasser, die eventuell zu einem unlöslichen Niederschlag geführt hat.

Nach Inkubation mit dem ^{35}S -Methionin wurden die 4 mL Kultur in 2 mL-Portionen aufgeteilt und zu jeweils 200 μL STOP-Lösung pipettiert („chase“). Das Chloramphenicol in der STOP-Lösung soll weiteren Einbau von ^{35}S -Methionin durch Translationsinhibition verhindern. Ein zusätzlicher Überschuss an nicht radioaktivem Methionin gewährt das gleiche, so dass mit diesem „pulse-chase“ Experiment eine Momentaufnahme der Proteinsynthese in der Zelle festgehalten werden kann.

Es folgt eine Waschprozedur zum Entfernen überschüssigen ^{35}S -Methionins. Nach Inkubation auf Eis (5 min) und Zentrifugation (13.000 upm, 3 min, 4°C) wurden die zwei Zellpellets mit insgesamt 200 μL WASCH-Lösung resuspendiert, in einem frischen Halbmikroreaktionsgefäß vereint und erneut zentrifugiert (13.000 upm, 3 min, 4°C). Die Zellpellets wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

STOP-Lösung	100	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	1	mg/mL	Chloramphenicol
	10	mM	Methionin

Die Lösung wurde nach Sterilfiltration in 200 μL Aliquots in 2 mL Halbmikroreaktionsgefäßen bei -20°C gelagert.

WASCH-Lösung	100	mM	Tris/HCl, pH 7,5
	0,1	mg/mL	Chloramphenicol

Die Lösung wurde nach Sterilfiltration in 800 μL Aliquots in 1 mL Halbmikroreaktionsgefäßen bei -20°C gelagert.

3.22.6 Zellaufschluss von Proben für ^{35}S -Gele

Der Zellaufschluss erfolgte wie bei den Coomassie/Silber-Proben durch Ultraschall (Abschnitt 3.22.2). Die gesamte Apparatur wurde dabei in Plastiktüten verpackt, um vor Kontamination durch Spitzer mit ^{35}S -Lösung zu schützen.

3.22.7 Quantifizierung von Proben für ^{35}S -Gele

Für ^{35}S -Gele wurden 600000 cpm pro Gel verwendet. Für die Ermittlung der Menge an Radioaktivität in einer Probe wurden 5 μL nicht lyophilisierte Probe auf ein Whatmanpapier (5x5 mm) pipettiert und in ein 25 mL Greinerröhrchen gegeben. Es wurde mit 10% Trichloressigsäure gewaschen (10 min, 4°C), dann mit 5% TCA-Lösung (10 min, 4°C) und zweimal mit Ethanol (10 min, RT). Die Filterpapiere wurden getrocknet und mit 3 mL Scintillationsflüssigkeit in ein Scintillationsgefäß gegeben, welches in einem Scintillationszähler analysiert wurde.

3.22.8 Gefriertrocknung von Proben für ^{35}S -Gele

Die Proben für die ^{35}S -Gele wurden genau wie die Proben für Coomassie/Silber-Gele lyophilisiert (gefriergetrocknet) (Abschnitt 3.22.3).

3.22.9 Erste Dimension 2D-Gele: Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung erfolgt die Trennung von Proteinen gemäß ihres isoelektrischen Punktes. Dieser ist als der pH-Wert definiert, bei dem das amphotere Protein keine Nettoladung mehr trägt. Bei dieser Trennmethode lässt man die Proteine in einem elektrischen Feld ein Gel durchlaufen, welches einen festen pH-Gradienten besitzt. Die Proteine laufen gemäß ihrer Nettoladung in dem elektrischen Feld bis zu der pH-Stelle im Gel, die ihrem isoelektrischen Punkt entspricht und bleiben dort ohne Nettoladung stehen. Die Polyacrylamid-Gele (*IPG-Strips*, *Amersham-Pharmacia*) werden mit verschiedenen pH-Bereichen hergestellt (z.B. pH 4-7) und sind für die einfachere Handhabung auf PVC-Streifen aufgebracht.

3.22.10 Rehydratisierung der *IPG-Strips*

Die IPG-Streifen werden lyophilisiert geliefert und können deshalb direkt mit Proteinlösung rehydratisiert werden. Zunächst wurden die lyophilisierten Proteinproben in 500 μL Rehydratisierungspuffer aufgenommen. Davon wurde die je nach Methode erforderliche Proteinmenge entnommen (Coomassie-Gele 400 μg Protein, Silverstain-Gele 100 μg Protein, ^{35}S -Gele 600000 cpm) und mit Rehydratisierungspuffer auf 450 μL aufgefüllt. Die im Rehydratisierungspuffer enthaltenen Pharmalyte sorgen im entsprechenden pH-Bereich für einen Feingradienten auf dem *IPG-Strips*, der die Proteintrennung verbessert. Die 450 μL Proteinlösung wurden gleichmäßig verteilt an die seitliche Kante der Rehydratisierungskammer pipettiert. Die aufgetauten und von Schutzfolie befreiten *IPG-Strips* wurden mit der Gelseite nach unten in die Probenschlitze auf die Proteinlösung gelegt und mit 4 mL

DryStripCover-Fluid (Amersham-Pharmacia) überschichtet. Mit einer Glasplatte abgedeckt rehydratisierten die Streifen mindestens 24 h bei RT.

Rehydatisierungspuffer	2,4	g	Harnstoff
	762	mg	Thioharnstoff
	100	mg	CHAPS
	62,5	μL	Pharmalyte (je nach pH-Bereich)
	21,9	mg	DTT
	ad. 5	mL	dH ₂ O

3.22.11 Fokussierung der *IPG-Strips*

Nach dem Rehydratisieren wurden die *IPG-Strips* für die isoelektrische Fokussierung auf die *Multiphor II* Apparatur (Amersham-Pharmacia) aufgelegt, als Spannungsquelle diente der *PowerPac 3000* (BioRad). Zuerst wurde mit 10 mL *DryStripCover-Fluid* als Kontaktmittel der Gelaufsatz auf die Kühlplatte des Systems luftblasenfrei aufgelegt. In den Gelaufsatz wurde nach Zugabe von 15 mL *DryStripCover-Fluid* die PVC-Schablone für die *IPG-Strips* eingesetzt. Auf die PVC-Schablone wurden schließlich die *IPG-Strips* mittig und mit der Gelseite nach oben ausgerichtet, wobei die auf die richtige Orientierung geachtet wurde (saures Ende zur Anode). Quer über die Enden der *IPG-Strips* wurde mit 5 mm Überlapp ein feuchtes Whatman-Papier (4x11,5 cm) gelegt und leicht angedrückt. Das Whatman-Papier nimmt Salze auf, die bei der isoelektrischen Fokussierung aus dem Gel laufen und sonst die Fokussierung stören würden. Auf den Überlapp von Gel-Enden und Papierstreifen wurden die Elektroden vorsichtig aufgesetzt und angedrückt. Schließlich wurden die *IPG-Strips* vollständig mit *DryStripCover-Fluid* bedeckt. Die Apparatur wurde vor dem Lauf mit einer Wasserkühlung auf 20°C temperiert und dann das Fokussierungsprogramm gestartet.

Fokussierungsprogramm	1.	0-500 V	1 mA	5 W	10 min
	2.	500 V	1 mA	5 W	5 h
	3.	500-3500 V	1 mA	5 W	5 h
	4.	3500 V	1 mA	5 W	25 h

3.22.12 Zweite Dimension 2D-Gele: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der zweiten Dimension der 2D-Gele werden die Proteine durch SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennt (Abschnitt 3.21). Die *IPG-Strips* mit den isoelektrisch fokussierten Proteinen (Abschnitt 3.22.9) werden für die Größentrennung auf Polyacrylamid-Gele aufgelegt. Somit laufen die gemäß ihres pI an verschiedenen Positionen innerhalb des *IEF*-Gels fokussierten Proteine an verschiedenen Stellen in das SDS-Gel ein und werden im Verlauf dieser zweiten Dimension nach Größe aufgetrennt. Auf dem resultierenden 2D-Gel haben alle Proteine auf

einer Horizontalen dieselbe Masse, während alle Proteine einer Vertikalen den gleichen pI besitzen. Für die Proteine in einem 2D-Gel kann also als ein Koordinatensystem verwendet werden, dessen Abszisse eine pI- und Ordinate eine MW-Skala besitzt. Durch die gute Reproduzierbarkeit der Methode lassen sich Gele verschiedener Proteinproben miteinander vergleichen. Zur Identifizierung von Proteinspots können diese aus dem Gel gestantzt, tryptisch verdaut und nach Massenchromatographie mit entsprechenden Datenbanken verglichen werden.

3.22.13 Gießen von 2D-Gelen (*Gelcasting*)

Für die Herstellung von bis zu 12 Gelen gleichzeitig wurde ein *Gelcaster* (BioRad) verwendet und nach Angaben des Herstellers zusammengebaut. Für ein Gel waren bereits vom Hersteller je zwei Glasplatten mit einem flexiblen Silicongelenk verbunden und mit *Spacern* auf einen Abstand von 1 mm Geldicke fixiert. Nach dem Aufbau des *Gelcasters* wurde das Trenngel bis zu einer Höhe von 2,5 cm unter den oberen Rand der niedrigeren Glasplatte eingefüllt (Tabelle 3.22-1). Dazu wurde das frisch angesetzte Trenngel von einem hochstehenden Vorratsbehälter durch einen Schlauch mit Klemme in die untere Zuleitung des *Gelcasters* laufen gelassen, so dass sich der *Gelcaster* von unten nach oben luftblasenfrei füllte. Die Gele wurden einzeln mit 1 mL Isopropanol überschichtet, um eine glatte und blasenfrei Oberfläche zu erhalten. Das Trenngel wurde über Nacht erschütterungsfrei zum Polymerisieren stehen gelassen und mit Folie und nassem Papier vor dem Austrocknen bewahrt.

Vor dem Giessen des Sammelgels wurde restliches Isopropanol auf dem festen Trenngel entfernt, die Geloberfläche gründlich mit dH_2O gewaschen und mit Whatmanpapierstreifen trockengetupft. Das Sammelgel wurde mit Hilfe von Spritze und Kanüle einzeln auf die Trenngele aufgetragen (Tabelle 3.22-2). Das Sammelgel wurde bis 2 mm unter den Rand des *Casters* gegossen, vorsichtig mit Isopropanol überschichtet und mit Folie und nassem Papier bedeckt. Die Polymerisation nahm etwa 4-5 h in Anspruch. Bei dem Ansetzen von Trenn- und Sammelgel wurden die Radikalstarter TMEDA (Tetramethylethylendiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) erst direkt vor dem Gelgießen zu den fertig gemischten Hauptkomponenten gegeben, um eine vorzeitige Polymerisation zu vermeiden.

Trenngel	12 Gele	10 Gele	8 Gele	6 Gele*	4 Gele	2 Gele	1 Gel
Acrylamid-Bis 29:1, 30%(w/v)	355 mL	296 mL	237 mL	178 mL	142 mL	71 mL	35,5 mL
2 M Tris/Cl, pH 8,8 dH ₂ O	160 mL	133 mL	107 mL	80 mL	64 mL	32 mL	16 mL
	277 mL	231 mL	185 mL	138 mL	111 mL	55 mL	28 mL
10% SDS- Lösung	8 mL	6,6 mL	5,3 mL	4 mL	3,2 mL	1,6 mL	0,8 mL
10% APS	2,80 mL	2,33 mL	1,86 mL	1,40 mL	1,12 mL	0,56 mL	0,28 mL
TMEDA	427 µL	356 µL	284 µL	213 µL	171 µL	85 µL	42 µL

* Für *Biorad-Gelcaster* optimierte Volumina; andere Werte sind extrapoliert

Tabelle 3.22-1

Sammelgel	12 Gele	10 Gele	8 Gele	6 Gele*	4 Gele	2 Gele	1 Gel
Acrylamid-Bis 29:1, 30%(w/v)	27 mL	22,5 mL	13,5 mL	10 mL	6,7 mL	3,4 mL	1,7 mL
0,5 M Tris/Cl, pH 6,8 dH ₂ O	27 mL	22,5 mL	13,5 mL	10 mL	6,7 mL	3,4 mL	1,7 mL
	55,8 mL	46,5 mL	28 mL	21 mL	14 mL	7 mL	3,5 mL
10% SDS- Lösung	1,11 mL	925 µL	555 µL	416 µL	277 µL	139 µL	69 µL
10% APS	277,4 µL	231,2 µL	138,7 µL	104 µL	69,4 µL	34,7 µL	17,4 µL
TMEDA	124,8 µL	104 µL	27,7 µL	20,8 µL	13,9 µL	6,9 µL	3,5 µL

* Für *Biorad-Gelcaster* optimierte Volumina; andere Werte sind extrapoliert

Tabelle 3.22-2

3.22.14 Äquilibration und Auflegen der *IPG-Strips*

Nach dem Ende der isoelektrischen Fokussierung (Abschnitt 3.22.9) wurden die *IPG-Strips* für die zweite Dimension vorbereitet. Dazu wurden sie 15 min in Äquilibrationlösung A und dann 15 min in Äquilibrationlösung B unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurden die *IPG-Strips* auf die SDS-Gele aufgelegt. Dazu wurde 1 mL heiße SDS-Agarose über die ganze Länge des Sammelgels pipettiert und der *IPG-Strip* mit zwei Pinzetten sofort in die Agarose bis auf das Sammelgel gedrückt. Die Agarose wird auf dem Sammelgel sehr schnell fest, so dass schnell gearbeitet werden muss. Luftblasen verzerren beim spätern Lauf das angelegte Elektrische Feld und müssen deshalb auf jeden Fall vermieden oder beseitigt werden.

Äquilibrationlösung	6 mL	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
	21,6 g	Harnstoff

	18	mL	87% Glycerol
	24	mL	10% SDS
	<i>ad.</i> 60	mL	dH ₂ O
Zusatz für A	105	mg	DTT
Zusatz für B	1	Spatelspitze	Bromphenolblau
SDS-Agarose	25	mL	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
	1	mL	10% SDS
	1	g	Agarose
	<i>ad.</i> 100	mL	dH ₂ O

3.22.15 2D-Gel Lauf

Die mit *IPG-Strips* belegten Gele wurden in die mit Laufpuffer gefüllte und auf 10°C temperierte *Protean Plus Dodeca Zelle* (Biorad) eingesetzt. Ein Lauf dauerte etwa 17 h bei konstanter Stromstärke. Da der Puffer im Tank sich mit jedem Lauf mehr verbrauchte, war der entsprechende Strom mit jedem Lauf zu erhöhen. Bei frisch angesetztem Laufpuffer (etwa 30 L) wurden pro Gel 20 mA eingestellt.

2D-Laufpuffer	30	g	Tris
	144	g	Glycin
	10	g	SDS
	<i>ad.</i> 10	L	dH ₂ O

3.22.16 Coomassie-Färbung von 2D-Gelen

Proteinspots konnten mit Hilfe des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue R-250* gefärbt werden. Dieses Verfahren zeichnet sich durch ein proportionales Verhältnis zwischen Farbintensität und Proteingehalt der Spots aus, ist aber nicht so empfindlich wie Silberfärbung (Abschnitt 3.22.17) oder gar Autoradiographie von ³⁵S-Gelen (Abschnitt 3.22.18).

Die zu färbenden Gele wurden zunächst in 2D-PAGE-Fixierer geschüttelt (60 min, RT) und anschließend im Färber (90 min, RT). Die Proteinspots wurden durch wiederholte Zugabe von Entfärber nach mehrstündige Inkubation sichtbar. Die gefärbten Gele wurden mit Wasser gespült und konnten in Folie eingeschweißt und bei 4°C gelagert werden.

2D-PAGE-Fixierer	50	% (v/v)	Methanol
	10	% (v/v)	Eisessig
	40	% (v/v)	dH ₂ O
2D-PAGE-Färber	25	% (v/v)	Methanol
	10	% (v/v)	Eisessig
	0,25	% (v/v)	<i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>
	65	% (v/v)	dH ₂ O

Der Färber wurde nach dem Ansetzen filtriert.

2D-PAGE-Entfärber	20	% (v/v)	Ethanol
	10	% (v/v)	Eisessig
	70	% (v/v)	dH ₂ O

3.22.17 Silber-Färbung von 2D-Gelen

Die Silber-Färbung (Rabilloud, 1990) ist empfindlicher als die Coomassie-Färbung (Abschnitt 3.22.16), allerdings ist die Farbintensität nicht proportional zur Proteinmenge.

Die Gele wurden erst in 2D-PAGE-Fixierer fixiert (20 min) und dann mit 50% (v/v) Methanol/H₂O-Gemisch und schließlich mit dH₂O zum Entfernen der Essigsäure gewaschen (je 20 min). Anschließend wurden die Gele in NaS₂O₃-Lösung inkubiert (1 min) und zweimal mit dH₂O gewaschen (je 1 min). Nach Inkubation in Silbernitrat-Lösung (20 min, 4°C) wurde zweimal mit dH₂O gewaschen (je 1 min). Die Gele wurden mit Entwickler unter ständiger Beobachtung geschüttelt. Bei der gewünschten Intensität der Spots wurde mit 5% Essigsäure gewaschen. Die Gele konnten in Folie eingeschweißt bei 4°C gelagert werden.

NaS₂O₃-Lösung, 0,02%	0,5	g	NaS ₂ O ₃
	2,4	L	dH ₂ O
AgNO₃-Lösung, 0,02%	2	g	AgNO ₃
	2	L	dH ₂ O
Entwickler	0,04	% (v/v)	Formalin
	2	% (w/v)	NaCO ₃ in dH ₂ O

3.22.18 Autoradiographie von ³⁵S-markierten Gelen

2D-Gele mit ³⁵S-markierten Proteinen können durch Autoradiographie abgebildet werden. Die Nachweisgrenze von Proteinen ist bei dieser Methode im Vergleich zu Coomassie- und Silbergefärbten Gelen wesentlich geringer.

Die Gele wurden in 2D-PAGE-Fixierer geschüttelt (60 min) und unter einem kontinuierlichen Wasserstrom gespült (120 min). Vor der Autoradiographie mussten die Gele erst getrocknet werden. Dazu wurden die Gele auf tropfnasse *Whatman*-Papier gelegt und auf dem Gelrockner (*FisherBrand*) getrocknet (120 min, 80°C). Die auf *Whatman*-Papier fixierten Gele wurden mit der Gelseite auf Röntgenfilme *Biomaxx MR* (*Kodak*) aufgelegt. Um bei verschiedenen Gelen eine vergleichbare Schwärzung der Filme zu erhalten, wurden alle Filme mit der gleichen Dosis bestrahlt. Die Dosis hängt von der Auflegezeit und der Radioaktivitätsmenge des jeweiligen Gels ab. In der Regel wurde für die Rehydratisierung (Abschnitt 3.22.10) eine Probenmenge von 600000 *cpm* pro Gel verwendet, und nach drei Tagen für Rehydratisierung, 1. Dimension, 2. Dimension und Trocknen der Film aufgelegt. Unter diesen Bedingungen wurden die Filme nach 4 Tagen entwickelt. Für andere Fälle

konnte zur Berechnung einer vergleichbaren Exposition folgende Formel verwendet werden (Gleichung 3-2). Für den Regelfall ergibt sich aus der Formel eine Exposition von $2,2 \cdot 10^6$ Dosispunkten.

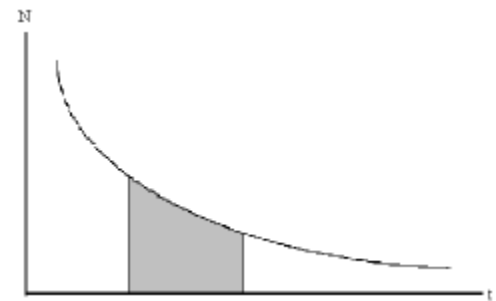
Aufgabe: Wie groß ist die radioaktive Exposition/Dosis im Zeitraum $t_1 - t_2$?

Ansatz: Radioaktiver Zerfall: $N(t) = N_0 \cdot e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} t}$
 $t =$ Zeit
 $t_{1/2} =$ Halbwertszeit, $t_{1/2} \text{ } ^{35}\text{S} =$
 $N =$ Radioaktivität in *cpm*
 $N_0 =$ Radioaktivität zur Zeit $t = 0$
 $N(t) =$ Radioaktivität zur Zeit t

Lösung: Integration der Funktion $N(t)$ von t_1 bis t_2

$$D = \int_{t_1}^{t_2} N(t) dt = \left| N_0 \cdot \left(-\frac{t_{1/2}}{0,693} \right) \cdot e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} t} \right|_{t_1}^{t_2}$$

$$= \left| N_0 \cdot \left(-\frac{t_{1/2}}{0,693} \right) \cdot e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} t_1} - e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} t_2} \right|_{t_1}^{t_2}$$



für $t_1 = 0$ ergibt sich:

$$D = \int_0^t N(t) dt = \left| N_0 \cdot \left(-\frac{t_{1/2}}{0,693} \right) \cdot \left(1 - e^{-\frac{0,693}{t_{1/2}} t} \right) \right|$$

Gleichung 3-2

Die Filme wurden für die Entwicklung in Entwickler geschwenkt (5 min), kurz mit Wasser gespült und anschließend in Fixierer geschwenkt (5 min). Nach gründlichem Spülen der Filme wurden diese zum trocknen aufgehängt.

Entwickler	500 ad. 5	g L	Kodak D-19 Entwicklerpulver dH ₂ O
Fixierer	500 50 ad. 2,5	g g L	Na ₂ S ₂ O ₃ ·5H ₂ O K ₂ S ₂ O ₅ dH ₂ O

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchungen zur Membranadaptation von *B. subtilis*

Die sinkende Umgebungstemperatur erniedrigt die Fluidität der Zellmembran und beeinträchtigt die mit der Membran gekoppelten essentiellen Funktionen (siehe Abschnitt 1.2.3). Um sich davor zu schützen kann die Zelle den Schmelzpunkt der Membran senken und so die Fluidität der Membran erhalten. Neben der *de novo* Synthese verzweigtkettiger Fettsäurereste kann dies auch durch Einfügen von *cis* Doppelbindungen in schon vorhandene Fettsäurereste der Membran durch die Fettsäuredesaturase Des erfolgen (Aguilar *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1999; Weber *et al.*, 2001b). Lediglich der Mechanismus der Aktivierung von Des nach Kälteschock ist bislang unbekannt. Außer der indirekten Regulation von Des durch die Topologie der DNA, gibt es allerdings aus Experimenten mit *Synechocystis* Hinweise auf eine direkte Regulation durch ein temperatursensitives Zweikomponentensystem (Suzuki *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2001) (siehe Abschnitt 1.2.3). Diese Erkenntnisse sollen als Ausgangspunkt für Untersuchungen zur Regulation von Des aus *B. subtilis* dienen.

4.1.1 Strategie zu Untersuchung der Regulation von *des*



Bei Betrachtung der Gene in der näheren Umgebung des Fettsäuredesaturasegens *des* fällt auf, dass in direkter Nachbarschaft hinter dem 3'-Ende von *des* (früher *yocE*) die zwei Gene *yocF* und *yocG* liegen. Die Sequenzanalyse der beiden Gene zeigt, dass *yocF* signifikante Homologie zu Histidinkinasen und *yocG* zu Responsregulatoren von Zweikomponentensystemen aufweisen. Deren genetische Anordnung zu *des* auf dem Chromosom führte zu der Vermutung, dass sie für die Regulation des Desaturasegens verantwortlich sind. Die Gene werden folgend als *desK* (*yocF*) und *desR* (*yocG*) bezeichnet¹. Um diese Vermutung zu bestätigen soll das Histidinkinasegen *desK* deletiert und durch eine Resistenzkassette ersetzt werden. Ist das Zweikomponentensystem DesKR für die Regulation von *des* verantwortlich, sollte dies in der Deletionsmutante Auswirkungen auf die Kälteinduktion von *des* haben. Diese Auswirkungen sind dann durch Wachstumseigenschaften und Northernblotanalyse der Mutante zu untersuchen. Es ist für diese Strategie noch einmal darauf hinzuweisen, dass der Stamm *B. subtilis* JH642 absichtlich verwendet wurde. In diesem Stamm

¹ Die Bezeichnung der Gene erfolgt nach der Publikation von Aguilar *et al.* (Aguilar *et al.*, 2001).

und isoleucinfreiem Medium ist die Desaturase das einzige Enzym zur Kälteadaptation der Membran (siehe Abschnitt 1.4). Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass die Desaturase nach Kälteschock auf 15°C in isoleucinfreiem Medium essentiell ist (Weber *et al.*, 2001b).

4.1.2 Konstruktion der *desK* Deletionsmutante CB10

Die Konstruktion von CB10 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *desK* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*NcoI*) und 3'*kan783*(*MluI*) von dem Plasmid pDG783 amplifiziert, mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *MluI* geschnitten und anschließend gereinigt. Für die 5' und 3' flankierenden Regionen von *desK* wurde das von Michael Weber freundlicherweise zur Verfügung gestellte Plasmid pMW_ Δ *des* ebenfalls mit *NcoI* und *MluI* geschnitten, gereinigt und mit der *kan*-Kassette ligiert. Das resultierende Plasmid pCB Δ *desK* wurde aus *E. coli* Top10 präpariert und nach Linearisierung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *desK* mit PCR kontrolliert.

4.1.3 Wachstumseigenschaften der *desK* Deletionsmutante CB10

Um die Auswirkung die Deletion von *desK* aus *B. subtilis* auf die Kälteanpassung der Zellmembran hat, wurden von der *desK* Deletionsmutante CB10 Wachstumskurven in isoleucinhaltigem (5 µg/mL) und isoleucinfreiem SMM-Medium aufgenommen, mit Tryptophan (5 µg/mL), Phenylalanin (5 µg/mL), Glucose (0,5%) und Spurenelementen als Zusätze. Dazu wurden je 200 mL vorgewärmtes Medium mit einer 3 mL Übernachtskultur zu einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und im Wasserbad bei 37°C und 220 upm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde eine Hälfte der Kultur weiter bei 37°C geschüttelt und die andere Hälfte in einen zweiten Erlenmeyerkolben überführt und sofort in einem auf 15°C temperierten Wasserschüttler bei 220 upm inkubiert (siehe Abbildung 4.1-1).

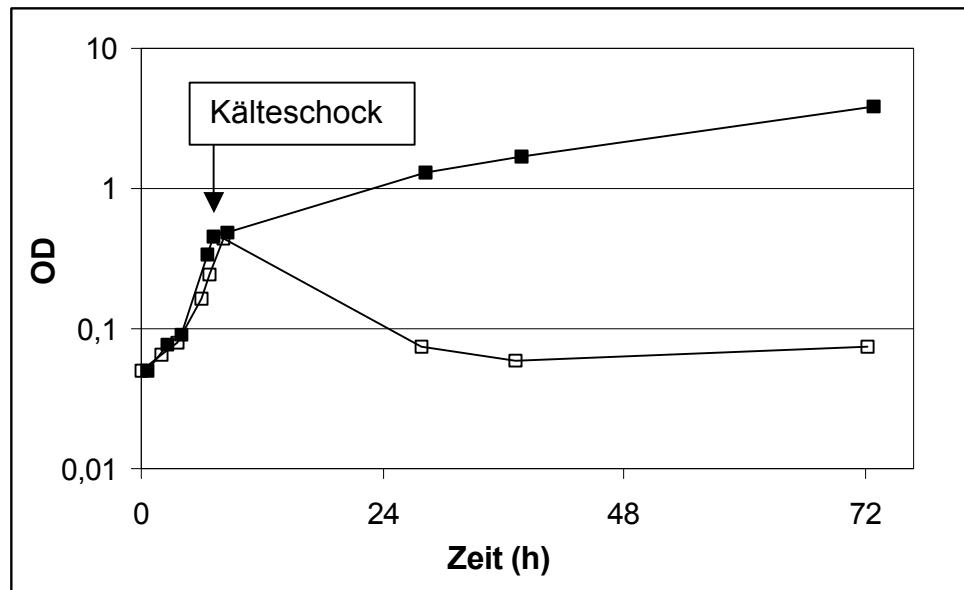


Abbildung 4.1-1 Wachstumskurve von CB10 nach Kälteschock
mit Isoleucin (gefüllte Quadrate) und ohne Isoleucin (offene Quadrate)

Jede Wachstumskurve wurde zumindest drei mal wiederholt. Die Wachstumskurven zeigen im Vergleich nach Kälteschock deutlich die Lyse von CB10 ohne Isoleucin, während CB10 mit Isoleucin bei 15°C langsam wächst. Damit ist das Wachstumsverhalten der *desK* Deletionsmutante CB10 wie das der *des* Deletionsmutante selbst, vgl. (Weber *et al.*, 2001b). Dies könnte damit erklärt werden, dass das Zweikomponentensystem DesKR als positiver Regulator nach Kälteschock für die Desaturase aus *B. subtilis* arbeitet, dessen Funktion in CB10 wegen der Deletion von *desK* ausbleibt.

4.1.4 Northernblotanalyse der *desK* Deletionsmutante CB10

Nach der Analyse des Wachstums von CB10 (siehe Abschnitt 4.1.3) kann mit einer Northernblotanalyse der Mechanismus der Regulation von *des* eingehender erfolgen. Da die bekannten Zweikomponentensysteme zu den Transkriptionsaktivatoren gehören, wurde im Folgenden die Transkription von *des* in dem *desK* Deletionsstamm CB10 nach Kälteschock untersucht. Zu Vergleichszwecken sollte die Transkription von *des* in *B. subtilis* JH642 dienen.

Um bei der Analyse einen möglichst großen Unterschied in der Transkriptionsaktivierung von *des* nach Kälteschock zu sehen wurde zunächst der Zeitpunkt maximaler Induktion nach Schock mit mRNA aus *B. subtilis* JH642 bestimmt. Dazu wurde *B. subtilis* JH642 in je 200 mL isoleucinhaltigem (5 µg/mL) und isoleucinfreiem SMM-Medium mit Tryptophan (5 µg/mL), Phenylalanin (5 µg/mL), Glucose (0,5%) und Spurenelementen bei 37°C und 220 upm herangezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die eine Hälfte der Kultur bei 37°C

weitergeschüttelt und die zweite Hälfte der Kultur in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und sofort in einem vorgekühlten Wasserbad bei 15°C und 220 upm geschockt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden für jede Bedingung doppelt Kulturproben entnommen die jeweils 15 OD Zellen² entsprachen. Die erste und zweite Probe wurden direkt vor und nach Kälteschock genommen, weitere sechs Proben im Abstand von 20 Minuten, also 0, 0, 20, 40, 60, 80, 100 und 120 min. Die Kulturproben wurden zur Isolation der mRNA verwendet und anschließend einer Northernblotanalyse im Dotblotverfahren unterzogen (siehe Abbildung 4.1-2). Als Ausgangsmaterial für die Sonde, zur Detektion der *des* mRNA, wurde ein DNA Fragment aus dem Strukturgen von *des* mit den Primern 5'*des*_Sonde und 3'*des*_Sonde+T7 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 mit PCR amplifiziert.

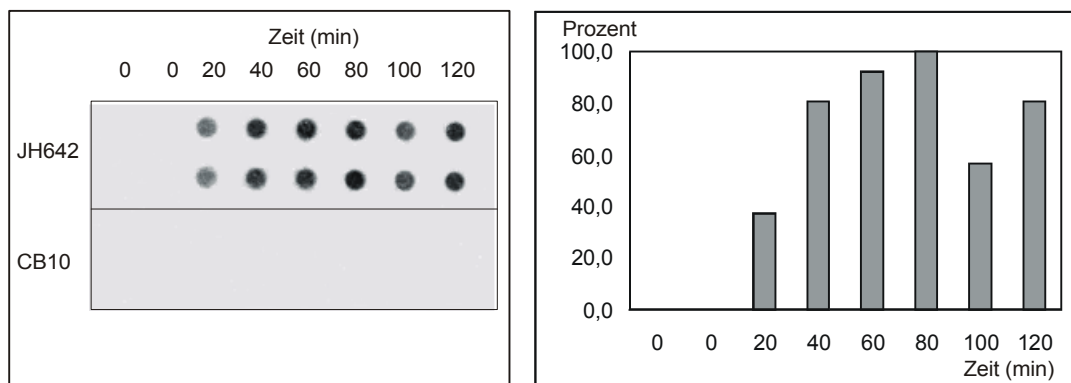


Abbildung 4.1-2 Zeitabhängige Transkription von *des* nach Kälteschock

Die Transkription von *des* bei 37°C in dem Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 ist in den ersten beiden Proben direkt vor und nach Kälteschock mit der Empfindlichkeit dieser Methode kaum nachzuweisen. Erst nach dem Kälteschock von 20 bis 120 min ist ein deutliches Signal für die *des* mRNA sichtbar. Dabei nimmt die Signalintensität erst ständig zu bis sie nach einem Maximum um 70 min nach Schock leicht wieder abfällt. Dieser Verlauf entspricht dem Verhalten für Kälteschockproteine, wie sie für diese Arbeit definiert wurde (siehe Abschnitt 1.1). Der zu untersuchende *desK* Deletionsstamm CB10 zeigt dagegen zu keinem Zeitpunkt vor oder nach Kälteschock ein detektierbares Signal für die Transkription von *des*.

Nach der Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Transkription von *des* mittels Dotblot wurde ein Northernblot zur Bestimmung der Transkriptgröße von *des* durchgeführt. Die Proben wurden wie für den Dotblot beschrieben hergestellt und es wurde wieder die Sonde gegen *des* verwendet (s.o.). Als Kontrollproben wurden *B. subtilis* JH642 bei OD₆₀₀ von 0,5

² 15 OD Zellen = x mL_{Probe} = 15/OD_{600Probe}

bei 37°C und 70 min nach Kälteschock bei 15°C verwendet. Entsprechend wurden aus der *desK* Deletionsmutante CB10 Proben für 37°C und 15°C entnommen. 70 min nach Kälteschock sollten die größten Unterschiede für ein *des* mRNA Signal zu beobachten sein. Die Proben wurden nach der RNA Präparation durch einen Northernblot analysiert (siehe Abbildung 4.1-3).

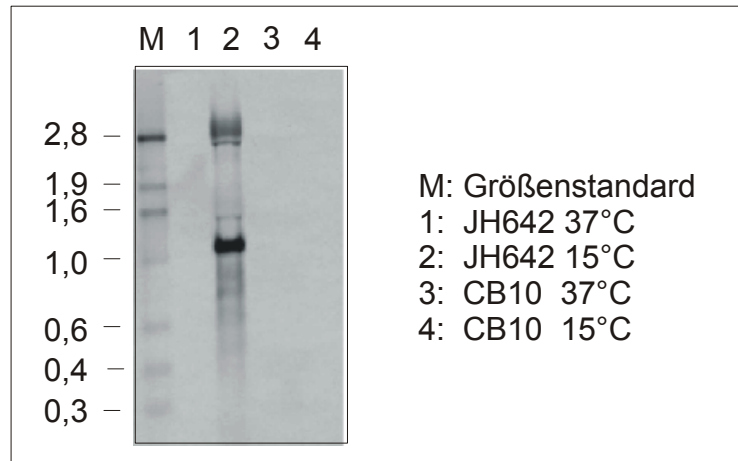


Abbildung 4.1-3 Northernblot von *des* in JH642 und CB10 bei 37°C und 15°C

Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus dem Dotblot ist für den Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 bei 37°C kein Signal für die Transkription von *des* erkennbar, 70 min nach Kälteschock bei 15°C jedoch eine deutliche Bande sichtbar. Für den *desK* Deletionsstamm ist weder bei 37°C noch bei 15°C ein Transkript von *des* nachzuweisen. Es fallen in dem Blot für die 15°C Probe von *B. subtilis* zwei signifikante Banden auf. Vorausgesetzt die eingesetzte Sonde ist für *des* mRNA spezifisch, müssen beide Transkripte für *des* kodieren. Die Größe der kleineren Bande entspricht der Transkription des *des* Gens. Die Größe der etwas schwächeren Bande entspricht der Länge eines Transkriptes mit den *des* und *desKR* Genen, die für das Zweikomponentensystem kodieren. Zwischen *des* und den *desKR* Genen liegt zwar durch eine Terminationsschleife ein putativer Transkriptionsstop, diese könnte aber bei der Transkription durch die RNA Polymerase zumindest partiell überlesen werden. Dies stimmt mit dem Northernblot überein da die größere Bande auch die schwächere ist. Eine physiologische Bedeutung wäre insofern vorhanden, da dies über die Aktivierung von *des* hinaus auch eine Selbstverstärkung des Regulators von *des* zur Folge hätte.

Die Ergebnisse aus dem Dotblot und aus dem Northernblot können nur dadurch erklärt werden, dass mit der Deletion des für die Histidinkinase des Zweikomponentensystems DesKR kodierenden Gens *desK* die Transkriptionsaktivierung von *des* nicht mehr erfolgt. Zusammen mit den Wachstumsexperimenten (siehe Abschnitt 4.1.3) ist damit bewiesen, dass das Zweikomponentensystem DesKR in temperaturabhängiger Weise für die

Transkriptionsaktivierung von *des* verantwortlich ist. Diese Ergebnisse decken sich mit den unabhängig erfolgten Untersuchungen zur Regulation von *des* aus *B. subtilis* der Arbeitsgruppe von de Mendoza (Aguilar *et al.*, 2001).

Aus den Untersuchungen über die Regulation der Fettsäuredesaturase Des aus *B. subtilis* ergibt sich folgendes Modell: Die Regulation der Fettsäuredesaturase erfolgt durch das temperaturabhängige Zweikomponentensystem DesKR (siehe Abbildung 4.1-4). Die Histidinkinase DesK phosphoryliert nach autophosphorylierung am konservierten Histidin bei sinkender Temperatur seinen entsprechenden Responsregulator DesR. Durch dessen spezifische Bindung an den *des*-Promotor wird die Transkription des *des*-Gens, das für die Fettsäuredesaturase Des kodiert, aktiviert.

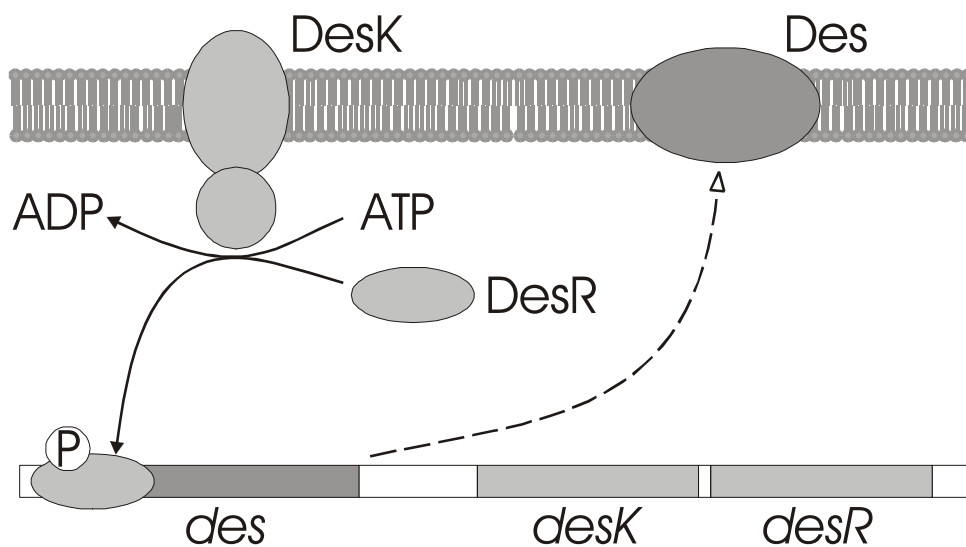


Abbildung 4.1-4 Regulation der Fettsäuredesaturase Des aus *B. subtilis*

Weiterführende Untersuchungen zur Regulation der Transkription von *des*, insbesondere zum Mechanismus der Temperaturwahrnehmung durch die Histidinkinase DesK und zur Proteininternen Signalweiterleitung von der temperatursensitiven Domäne zur Phosphorylierungsdomäne von DesK wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Karen Hunger durchgeführt (Hunger, 2002).

4.2 Untersuchungen zur allgemeinen Kälteschockregulation durch das Zweikomponentensystem DesKR aus *B. subtilis*

Nachdem gezeigt wurde, dass das Zweikomponentensystem DesKR für die Kälteschockregulation der Fettsäuredesaturase *des* verantwortlich ist (siehe Abschnitt 4.1), sollte untersucht werden, ob das kältesensitive Zweikomponentensystem DesKR auch die Transkription weiterer Kälteschockgene aktiviert (Beckering *et al.*, 2002). Dies ist insofern von Bedeutung, da bislang kein zentraler Regulationsmechanismus für die Kälteschockantwort gefunden wurde. Das Zweikomponentensystem DesKR bietet als temperaturabhängiger Transkriptionsaktivator die nötigen Voraussetzungen, für die Signalwahrnehmung und -weiterleitung zur allgemeinen Aktivierung eines Kälteschockregulons in *B. subtilis*.

4.2.1 Strategie zur Identifizierung des DesKR Regulons

Die Identifikation von Genen eines unbekannten Regulons erfordert im Idealfall die Analyse der Aktivierung aller Genen des Chromosoms durch den bekannten Regulator. Eine solche Analyse ist mit Hilfe der genomweiten Transkriptionsanalyse durch DNA Arrays möglich (Beckering *et al.*, 2002). Durch den Vergleich der nach Kälteschock transkribierten Genen in *B. subtilis* JH642 und in der *desK* Deletionsmutante CB10 sollten die durch das Zweikomponentensystem DesKR regulierten Gene zu identifizieren sein. Im Unterschied zum Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 wird in der Mutante das *des* Gen nicht mehr durch DesKR aktiviert. Als Positivkontrolle, für die Identifikation der von DesKR aktivierten Gene, kann *des* herangezogen werden, weil die Regulation dieses Genes durch DesKR schon bekannt ist (siehe Abschnitt 4.1).

4.2.2 Genomweite Transkriptionsanalyse der *desK* Deletionsmutante CB10

Für die genomweite Transkriptionsanalyse der *desK* Deletionsmutante CB10 wurden Kulturproben von CB10 und von *B. subtilis* JH642 als Vergleichsstandard genommen. Dazu wurden beide Stämme in je 200 mL SMM-Medium mit Isoleucin (5 µg/mL), Tryptophan (5 µg/mL), Phenylalanin (5 µg/mL), Glucose (0,5%) und Spurenelementen bei 37°C und 220 upm herangezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die eine Hälfte jeder Kultur bei 37°C weitergeschüttelt. Die zweite Hälfte der Kultur wurde in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und sofort in einem vorgekühlten Wasserbad bei 15°C und 220 upm geschockt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden für jeden Stamm Kulturproben entnommen, die jeweils 15 OD Zellen entsprachen (siehe Fußnote 2 Seite 59). Die erste Probe wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C und die zweite Probe 70 min nach Kälteschock bei 15°C entnommen. Der

Zeitpunkt für die 15°C Probe wurde so gewählt, da das Desaturasegen *des*, welches durch das zu untersuchende Zweikomponentensystem DesKR reguliert wird, ein Transkriptionsmaximum 70 min nach Kälteschock hat (siehe Abschnitt 4.1.4). Damit sollten in der Arrayanalyse möglichst große Signaldifferenzen für die von DesKR regulierten Gene erhalten werden. Zur Bestimmung der Qualität, der aus den Kulturproben für die DNA Arrays präparierten mRNA, wurde zunächst eine Kapillarelektrophorese durchgeführt (siehe Abbildung 4.2-1).

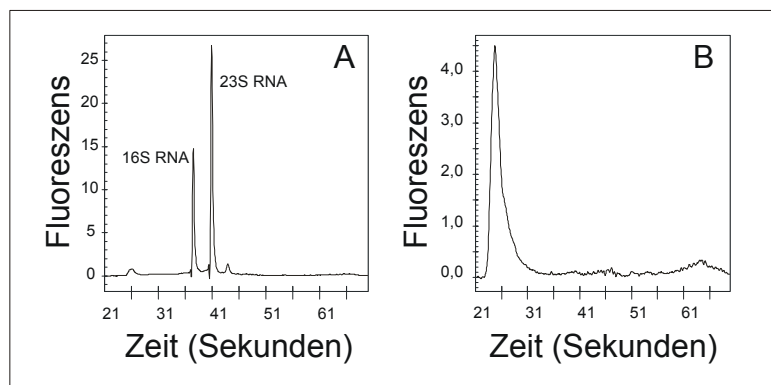


Abbildung 4.2-1 Kapillarelektrophorese zur Qualitätskontrolle der mRNA

A: durchschnittliche mRNA Probe

B: degradierte mRNA Probe durch 5 Sekunden Hautkontakt
(die Elektropherogramme sind unterschiedlich skaliert)

Bei der Kapillarelektrophorese einer intakten RNA Probe sind deutlich zwei prominente Peaks der 16S und der 23S RNA zu erkennen (Abbildung 4.2-1A). Das Verhältnis der Fläche der beiden Peaks gibt Aufschluss über die Qualität bzw. die Degradation der RNA. Ein Hautkontakt kann durch die Aktivität der zahlreichen menschlichen RNasen die RNA Probe in wenigen Sekunden vollständig degradieren (Abbildung 4.2-1B).

Über die Kontrolle zur Qualität der präparierten RNA hinaus, wurden die RNA Proben im Vorfeld zur Arrayanalyse auch noch mit einem Northernblot überprüft. Dazu wurde das Transkriptionsmuster des bekannten Kälteschockgens *cspB* und des Hitzeschockgens *groEL* getestet. Als Ausgangsmaterial für die *cspB* Sonde wurde ein DNA Fragment aus dem Strukturgen von *cspB* mit den Primern 5'*cspB*_Sonde und 3'*cspB*_Sonde+T7 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 mittels PCR amplifiziert. Die *groEL* Sonde wurde freundlicher Weise von Leif Steil zu Verfügung gestellt (Beckering *et al.*, 2002). Beide Sonden wurden getrennt mit RNA Proben aus CB10 und dem Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 vor und nach Kälteschock für einen Northernblot eingesetzt (siehe Abbildung 4.2-2).

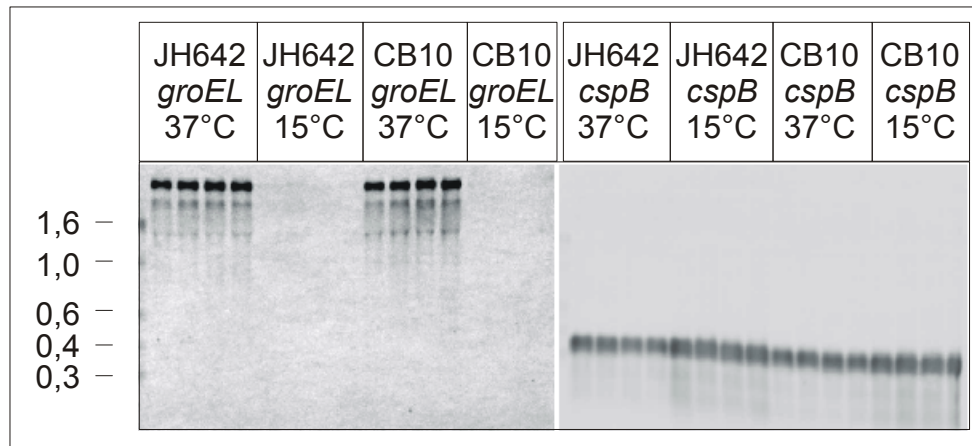


Abbildung 4.2-2 Northernblot von *cspB* und *groEL* vor und nach Kälteschock in *B. subtilis* JH642 und CB10

Auf dem Northernblot sind für *groEL* deutliche Banden in der 37°C Probe sowohl in *B. subtilis* JH642 als auch CB10 zu erkennen, dagegen ist bei 15°C kein Transkript zu sehen. Dies entspricht dem erwarteten Muster für ein Hitzeschockgen, das nach Kälteschock reprimiert wird. Auf dem Northernblot ist für *cspB* sowohl Transkript in der 37°C Probe als auch in der 15°C Probe beider Stämme zu erkennen. Dabei ist die Induktion nach Kälteschock bei *cspB* auf Transkriptionsebene nur sehr mäßig. Die sehr starke Induktion von CspB nach Kälteschock kann folglich nur durch Induktion auf posttranskriptionaler Ebene erklärt werden. Diese Daten stimmen mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe Schweder überein (Kaan *et al.*, 1999).

Die so überprüfte RNA wurde durch reverse Transkription mit ^{33}P markiert und die gelabelte cDNA für den DNA Array mit einer Membran mit *B. subtilis* Genen hybridisiert. Die so radioaktiv markierten Membranen wurden nach Auflegen auf Phosphorscreens am Phosphoimager eingescannt. Dieser Vorgang wurde für jeweils drei unabhängige Proben wiederholt, so dass für die computergestützte Auswertung drei Parallelen genutzt wurden, um die Ergebnisse statistisch zu sichern. Um die durch das Zweikomponentensystem DesKR kälteinduzierten Gene zu identifizieren, wurden die kälteinduzierten Gene in der *desK* Deletionsmutante mit denen des Kontrollstamms *B. subtilis* JH642 verglichen. Aus der Differenz des Vergleichs ergaben sich die gesuchten Gene (siehe Abbildung 4.2-3) (Beckering *et al.*, 2002).

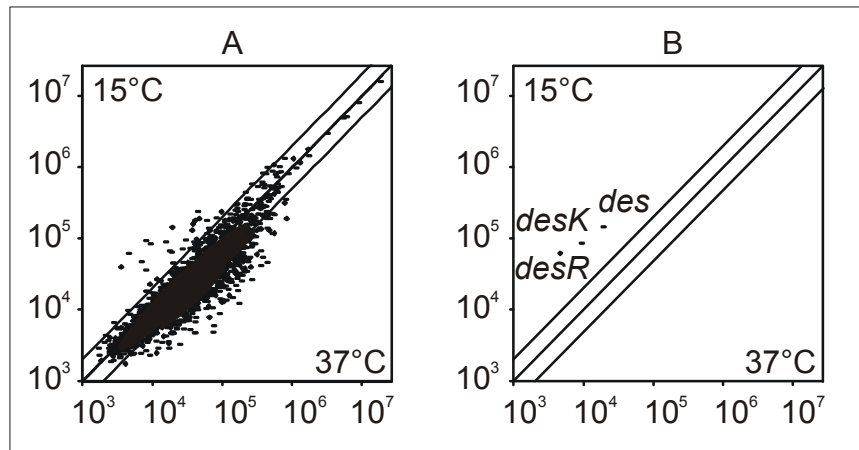


Abbildung 4.2-3 Scatter-Diagramme der DNA Arrayanalyse des DesKR Regulons

A: Kälteinduzierte und -reprimierte Gene in *B. subtilis* JH642

B: In CB10 nicht mehr kälteinduzierte Gene.

(Die zwei Parallelen zur Mitteldiagonale zeigen zweifache Induktion bzw. Repression an.)

Durch das Scatterdiagramm in Abbildung 4.2-3B wird deutlich, dass in CB10 die Transkription von nur drei Genen durch die Deletion von *desK* nicht mehr kälteinduziert ist. Dabei bedingt die Deletion von *desK* in CB10 direkt die fehlende Transkription von *desK* und *desR*. Das einzige verbleibende durch das Zweikomponentensystem DesKR kälteinduzierte Gen ist dementsprechend *des*, was soweit mit den vorausgegangenen Untersuchungen übereinstimmt (siehe Abschnitt 4.1). Dieses Ergebnis führt zu der Schlussfolgerung, dass das Zweikomponentensystem DesKR kein allgemeiner Kälteschockregulator in *B. subtilis* ist, sondern einzig und allein die spezifische Regulation der Fettsäuredesaturase vornimmt (Beckering *et al.*, 2002).

4.3 Identifizierung kälteinduzierter Gene in *B. subtilis*

Viele wichtige Komponenten wie die Struktur und Funktion der CSP wurden im Rahmen der Kälteschockantwort bereits untersucht. Außerdem gab es Ansätze zur Identifikation möglichst vieler kälteinduzierter Proteine in frühen Untersuchungen durch zweidimensionale Gelelektrophorese (Graumann *et al.*, 1996). Darüber hinaus sind aber mit den heute entwickelten modernen Analysemethoden keine systematischen Untersuchung zur Beteiligung von bislang unbekannten Komponenten der Kälteschockantwort in *B. subtilis* erfolgt. Denkbar wäre zu diesem Zweck sowohl die Untersuchung des Proteoms als auch des Transkriptoms von *B. subtilis* nach Kälteschock. Die Transkriptionsanalyse durch DNA Arrays bietet den Vorteil, dass alle Gene von vornherein bekannt sind und außerdem keine Rücksicht auf eventuelle Löslichkeit oder Lokalisation (z.B. Membran) von Proteinen genommen werden muss, die bei der Proteomanalyse durch zweidimensionale Gelelektrophorese zu beachten sind. Ziel dieser Untersuchung ist die umfassende Identifikation der kälteinduzierten Gene in *B. subtilis* nach Kälteschock.

4.3.1 Strategie zur Identifizierung kälteinduzierter Gene in *B. subtilis*

Zur Identifizierung der kälteinduzierten und auch -reprimierten Gene sollte eine Genomweite Transkriptionsanalyse durchgeführt werden. Dazu sollten Transkriptionsdaten von Kulturproben aus *B. subtilis* JH642 vor und nach einem Kälteschock miteinander verglichen werden, um eine Liste der gesuchten Gene aus dem gesamten Chromosom von *B. subtilis* zu erstellen. Parallel zu der Transkriptionsanalyse sollen Kälteinduzierte Proteine durch zweidimensionale Gelelektrophorese identifiziert werden. Die zweigleisige Strategie soll zum einen durch den direkten Vergleich die Überprüfbarkeit der Ergebnisse erreichen und zum anderen auch die Identifikation posttranskriptional induzierter Proteine durch die zweidimensionale Gelelektrophorese ermöglichen.

4.3.2 Genomweite Transkriptionsanalyse von kältegeschocktem *B. subtilis* JH642 durch DNA Arrays

Die Durchführung der Experimente zur Transkriptionsanalyse von *B. subtilis* vor und nach Kälteschock erfolgte bereits im Rahmen der Untersuchungen zur Identifikation des DesKR Regulons (siehe Abschnitt 4.2.2). Ein repräsentativer Ausschnitt eines Falschfarbenoverlays der Arrays für den direkten Vergleich von *B. subtilis* JH642 vor und nach Kälteschock ist in Abbildung 4.3-1 dargestellt (Beckering *et al.*, 2002).

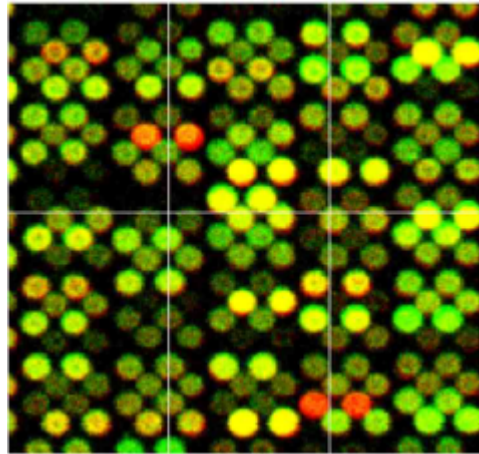


Abbildung 4.3-1 Repräsentativer Ausschnitt aus einem Falschfarbenoverlay der Arrays

rot : induzierte, grün: reprimierte, gelb: unveränderte mRNA Mengen
(alle Gene sind zur Reproduktion doppelt nebeneinander gespottet)

Zweifach stärkere oder schwächere mRNA Mengen bei dem Vergleich der 37°C und der 15°C Probe von *B. subtilis*, wurden als signifikante Veränderungen durch den Kälteschock betrachtet. Dabei stellte sich heraus, dass sich eine Gruppe von 80 unterschiedlich stark kälteinduzierten und eine weitaus größere Gruppe von 280 kältereprimierten Genen nach 70 min Kälteschock aus den Arraydaten ergibt. Unter den kälteinduzierten Genen sind etwa die Hälfte von bislang unbekannter Funktion (Y-Gene³). Gerade in dieser Gruppe befinden sich möglicherweise Gene, deren Proteine auf noch nicht charakterisierte Weise eine Rolle in der Kälteschockanpassung von *B. subtilis* spielen. Sie sind deshalb interessante Kandidaten für weitere Untersuchungen. Eine beschränkte Auswahl von kälteinduzierten und -reprimierten Genen ist in Tabelle 4.3-1 dargestellt. Eine alphabetisch geordnete Liste aller kälteinduzierten und -reprimierten Gene ist im Anhang eingefügt. Die Liste des Transkriptionsprofils des kompletten Genoms von *B. subtilis* JH642 nach 70 min Kälteschock von 37°C auf 15°C ist über die Internetdatenbank CSDBase verfügbar unter <http://www.chemie.uni-marburg.de/~csdbase> (Weber *et al.*, 2002).

³ Y-Gene, unbekannte Gene im Sequenzierungsprojekt bekamen die Klassifizierung der „Warum“-Gene (engl. „why“-genes = Y-genes).

Tabelle 4.3-1 Transkriptionsprofil von *B. subtilis* JH642 Genen nach 70 min Kälteschock von 37°C auf 15°C (Beckering *et al.*, 2002)

Gen (Induktion 15°C/37°C)	Genprodukt (Funktion)
Y-Gene	
<i>yplP</i> (8.1)	putativer σ^L abhängiger Transkriptionsaktivator
<i>ylaG</i> (3.3)	homolog zu GTP bindenden Elongationsfaktoren
<i>ydeB</i> (6.7)	unbekannt
<i>yhfH</i> (14.7)	unbekannt
<i>ydjO</i> (6.2)	unbekannt
<i>veg</i> (6.2)	unbekannt
<i>ytrA</i> (4.8), <i>ytrB</i> (2.2), <i>ytrC</i> (5.2), <i>ytrD</i> (4.5), <i>ytrE</i> (5.8), <i>ytrF</i> (7.5)	homolog zu ABC Transporter (Hunger, 2002)

bekannte kälteinduzierte Gene

<i>des</i> (10.7)	Fettsäuresaturase Des
<i>desK</i> (11.9)	Histidinkinase DesK (Regulation von <i>des</i>)
<i>desR</i> (18.5)	Responsregulator DesR (Regulation von <i>des</i>)
<i>cspB</i> (2.3)	Hauptkälteschockprotein CspB
<i>cspC</i> (9.1)	Kälteschockprotein CspC
<i>cspD</i> (1.9)	Kälteschockprotein CspD
<i>ydbR</i> (2.6), <i>yqfR</i> (2.3)	DEAD Box Helikasen
<i>rbfA</i> (2.6)	Ribosomaler Bindefaktor
<i>rplE</i> (2.3), <i>rplF</i> (2.7), <i>rplN</i> (2.1), <i>rplR</i> (3.2), <i>rplX</i> (2.3), <i>rpmD</i> (2.2), <i>rpmJ</i> (2.0), <i>rpsE</i> (2.5), <i>rpsH</i> (3.0), <i>rpsM</i> (2.7), <i>rpsN</i> (2.1)	Ribosomale Proteine
<i>infA</i> (2.3), <i>infB</i> (2.1)	Initiationsfaktor IF1 und IF2
<i>gyrA</i> (2.1), <i>gyrB</i> (2.2)	DNA Gyrase (erzeugt negativen Supercoil)

bekannte kältereprimierte Gene

<i>topA</i> (0.5)	DNA Topoisomerase I (entspannt negativen Supercoil)
<i>hrcA</i> (0.3)	Transkriptionsregulator (CIRCE)
<i>grpE</i> (0.2), <i>dnaK</i> (0.2), <i>dnaJ</i> (0.3), <i>yqeT</i> (0.4), <i>yqeU</i> (0.5)	Chaperone (Klasse I Hitzeschockgene)
<i>groEL</i> (0.2), <i>groES</i> (0.1)	Chaperone (Klasse I Hitzeschockgene)
<i>clpP</i> (0.4)	Clp Protease Untereinheit (Klasse III Hitzeschockgen)
<i>ahpC</i> (0.4), <i>ahpF</i> (0.4)	Alkylhydroperoxidreduktase (Klasse IV Hitzeschockgen)
<i>argB</i> (0.3), <i>argC</i> (0.8), <i>argD</i> (0.4), <i>argG</i> (0.5), <i>argH</i> (0.4), <i>argJ</i> (0.2), <i>aroA</i> (0.1), <i>aroB</i> (0.5), <i>aroF</i> (0.3), <i>aroH</i> (0.4), <i>asd</i> (0.3), <i>aspB</i> (0.3), <i>carA</i> (0.4), <i>dapB</i> (0.5), <i>dapG</i> (0.4), <i>glnA</i> (0.3), <i>gltA</i> (0.3), <i>gltB</i> (0.3), <i>glyA</i> (0.4), <i>hom</i> (0.5),	Aminosäurebiosynthese

<i>ilvD</i>	(0.5),	<i>metE</i>	(0.3),	
<i>proB</i>	(0.4),	<i>proH</i>	(0.4),	
<i>serA</i>	(0.1),	<i>serC</i>	(0.2),	
<i>thrC</i>	(0.5)			
<i>aspS</i>	(0.4),	<i>hisS</i>	(0.2),	tRNA Synthetasen
<i>metS</i>	(0.4),	<i>thrS</i>	(0.5)	
<i>purF</i>	(0.5),	<i>purN</i>	(0.5),	Purinbiosynthese
<i>purQ</i>	(0.3),	<i>purL</i>	(0.3),	
<i>purM</i>	(0.6),	<i>purK</i>	(0.2),	
<i>purE</i>	(0.2),	<i>purC</i>	(0.3),	
<i>purB</i>	(0.2),	<i>guaB</i>	(0.2),	
<i>ndK</i>	(0.4)			
<i>pyrA</i>	(0.5),	<i>pyrB</i>	(0.7),	Pyrimidinbiosynthese
<i>pyrC</i>	(0.4)			
<i>nifS</i>	(0.4),	<i>nadA</i>	(0.3),	NAD Biosynthese
<i>nadB</i>	(0.5),	<i>nadC</i>	(0.4)	
<i>upp</i>	(0.4)			Uracil Phosphoribosyltransferase (Pyrimidineaufnahme)
<i>prs</i>	(0.3)			Phosphoribosyl-Pyrophosphate Synthetase
<i>pgi</i>	(0.4),	<i>pgk</i>	(0.5),	Glycolyse
<i>tpi</i>	(0.4)			
<i>pdhA</i>	(0.2),	<i>pdhB</i>	(0.3),	Pyruvat Dehydrogenase
<i>pdhC</i>	(0.5),	<i>pdhD</i>	(0.5)	
<i>sucC</i>	(0.4),	<i>sdhC</i>	(0.4),	Zitronensäurezyklus
<i>citG</i>	(0.5)			
<i>atpA</i>	(0.3),	<i>atpB</i>	(0.1),	ATP Synthase
<i>atpE</i>	(0.2),	<i>atpF</i>	(0.2),	
<i>atpH</i>	(0.3),	<i>atpI</i>	(0.4)	

Die ausführliche Diskussion des Transkriptionsprofils der in der Tabelle aufgeführten Gene erfolgt in der Diskussion. Die Arraydaten stimmen in Bezug auf die Induktion bekannter Kälteschockgene und die Repression von Hitzeschockgenen mit den Erwartungen überein. Als Kontrolle dienen *cspB*, *des*, und *groEL* deren Transkription nach Kälteschock in *B. subtilis* JH642 zuvor durch einen Northernblot analysiert wurde (siehe Abschnitt 4.2.2). Auf den ersten Blick fällt auf, dass viele der kälteschockreprimierten Gene für Hitzeschockproteine (DnaK, DnaJ, GroEL, GroES), Enzyme des Energiestoffwechsels (ATP Synthase, Pyruvat Dehydrogenase), der Aminosäure- und Nukleotidbiosynthese (Pyrimidine, Purine, NAD) kodieren. Der allgemeine Rückgang der Proteinbiosynthese nach Kälteschock wurde auch schon für *E. coli* beschrieben (Jones *et al.*, 1987). Dagegen kodiert die Gruppe der kälteschockinduzierten Gene für Proteine, die an der sofortigen Kälteanpassung von *B. subtilis* beteiligt sind. Dazu gehören die Desaturase und das Zweikomponentensystem DesKR für die Membrananpassung (siehe Abschnitt 1.2.3), die Gyrase zur Einführung negativen Supercoils in die DNA (siehe Abschnitt 1.2.4), die CSP und zwei putative RNA-Helikasen YdbR und YqfR als Wegbereiter der mRNA zwischen Transkription und Translation (siehe Abschnitte 1.2.1 und 1.2.2), sowie eine Zahl ribosomaler und

ribosomenassoziierten Proteine zur Optimierung der Translation für niedrige Temperaturen. Die Arraydaten werden auch durch Ergebnisse aus Untersuchungen von kältegeschocktem *B. subtilis* durch zweidimensionale Gelelektrophorese bestätigt (siehe Abschnitt 4.3.3) und frühere Untersuchungen (Graumann *et al.*, 1996). Eine Auswahl bislang unbekannter kälteinduzierter Gene (*yplP*, *ylaG*, *yorG*, *ydeB*, *yhfH*, *ydjO*, *veg*, *yqfR*, *ydbR*) sollen in dieser Arbeit auf ihre Rolle bei der Kälteschockanpassung untersucht (siehe Abschnitt 4.4), um das bestehende Verständnis der Anpassung von *B. subtilis* JH642 an niedrige Temperaturen zu erweitern.

4.3.3 Proteomanalyse von kältegeschocktem *B. subtilis* JH642 durch zweidimensionale Gelelektrophorese

Zur Identifizierung kälteinduzierter Proteine wurden ^{35}S markierte Proteinproben von exponentiell wachsenden *B. subtilis* JH642 Kulturen vor und nach Kälteschock von 37°C auf 15°C miteinander verglichen. Dazu wurden die Proben zunächst durch zweidimensionale Gelelektrophorese nach pI und Masse getrennt und autoradiographiert. Die entwickelten Filme wurden anschließend elektronisch gescannt und für die optische Auswertung überlagert (siehe Abbildung 4.3-2) (in Zusammenarbeit mit Leif Steil und Prof. Dr. Uwe Völker, AG Funktionelle Genomforschung, Greifswald). Die Identifizierung der Proteine erfolgte aus Coomassie gefärbten Gelen nach tryptischen Verdau durch Massenspektrometrie (in Zusammenarbeit mit Dr. Uwe Linne, Frank Wiegeshoff und Karen Hunger, AG Marahiel, Marburg). Die farbliche Überlagerung der ^{35}S markierten Proteinproben aus *B. subtilis* bei 37°C und 15°C ermöglicht eine schnelle und zuverlässige Beurteilung der Induktion bzw. Repression des Proteinpatterns. Besonders deutlich tritt die Induktion der CSP hervor, die zu den am stärksten kälteinduzierten Proteinen gehören. Ein ebenso stark kälteinduziertes Protein ist YlaG. YlaG ist ein Beispiel für die Übereinstimmung von zweidimensionaler Gelelektrophorese und Makroarrays, weil das *ylaG* Gen auch transkriptionell induziert ist. Einige für den Kälteschock interessante Proteine, deren Gene durch die genomweite Transkriptionsanalyse identifiziert wurden (siehe Abschnitt 4.3.2), sind auf den Gelen nicht zu beobachten. Sie gehören entweder zu der Membranfraktion (Des, DesK) oder liegen außerhalb des gemessenen pH Bereichs von 4-7 (YdbR, YqfR). Eine weitere Erkenntnis aus den Kälteschockexperimenten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese ist die deutliche Abnahme der Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese. Bei Untersuchungen, in denen die Neusynthese von Proteinen durch *pulse-chase* Experimente mit ^{35}S markiertem Methionin verfolgt werden konnte, betrug die Synthese bei 15°C nur einem Bruchteil der Synthese bei 37°C.

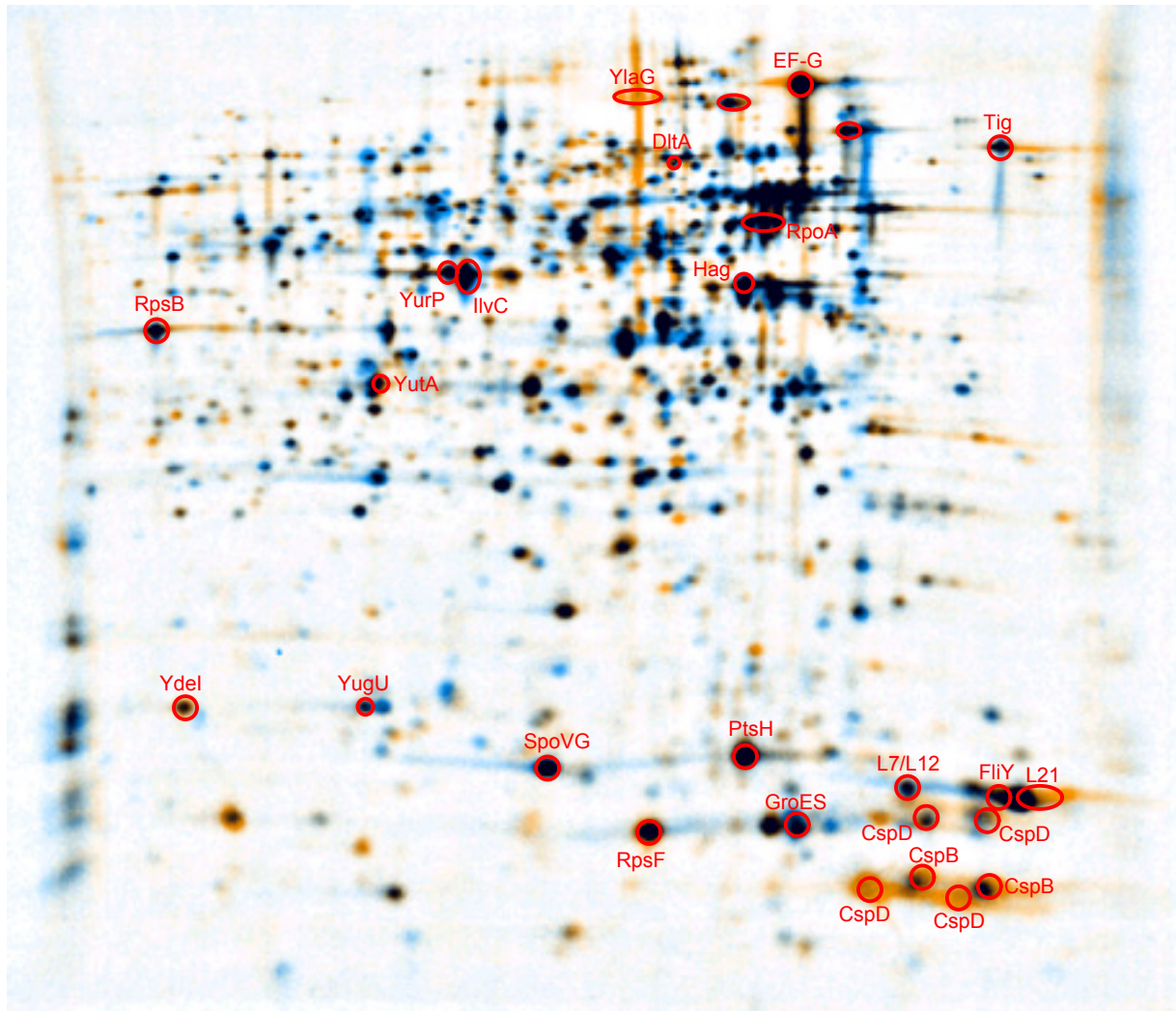


Abbildung 4.3-2 2D-Gel Überlagerung von *B. subtilis* JH642 37°C und 15°C

orange: kälteinduzierte Proteine
 blau: kältereprimierte Proteine
 schwarz: unveränderte Proteine

4.4 Untersuchung kälteinduzierter Gene aus *B. subtilis* JH642

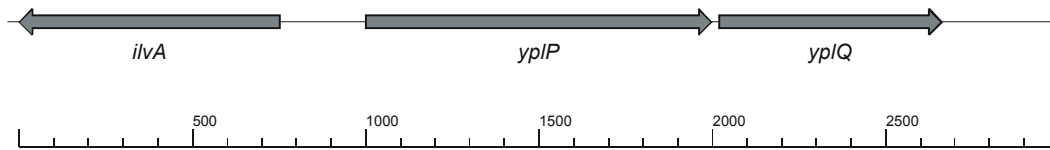
Mit der Identifizierung kälteinduzierter Gene aus *B. subtilis* JH642 durch die DNA Arrays (siehe Abschnitt 4.3) wurde die Voraussetzung für deren Untersuchung geschaffen. Insbesondere soll die Rolle der zahlreichen Gene mit bislang unbekannter Funktion für die Kälteschockantwort geklärt werden.

4.4.1 Strategie zur Charakterisierung kälteinduzierter Gene

Bei der Auswahl der zu charakterisierenden Gene von den Arraydaten wurde in erster Linie auf die möglichst starke Kälteinduktion geachtet. Ein weiteres Kriterium war die Stärke der Transkription, wobei Gene mit allgemein hoher Transkription bevorzugt wurden. Weiterhin wurde für die unbekannten Gene in Datenbankanalysen nach homologen Genen bekannter Funktion gesucht, um vielleicht funktionell interessante aber nicht besonders stark induzierte Gene nicht zu übersehen. Demnach wurden folgende Gene für eine weitergehende Charakterisierung im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt: *yplP*, *ylaG*, *yorG*, *ydeB*, *yhfH*, *ydjO*, *veg*, *yqfR* und *ydbR*. Weitere Gene wurden im Rahmen der Diplomarbeiten von Karen Hunger (*ytrABCDEF*, *des* und *desKR*) (Hunger, 2002) und Frank Wiegeshoff (*yocG*, *yplQ*, *yoaS*, *ycnL*, *ybdO*, *yesX* und *dltA*) (Wiegeshoff) bearbeitet.

Für die Charakterisierung dieser kälteinduzierten Gene mit bislang unbekannter Funktion sind folgende Untersuchungen denkbar. Zunächst sollen Deletionsmutanten konstruiert werden, deren Wachstumsverhalten nach einem Kälteschock von 37°C auf 15°C mit *B. subtilis* JH642 verglichen werden kann. Darüber hinaus sind abhängig von den Ergebnissen der Wachstumskurve weitere Experimente möglich. Darunter fallen die Proteomanalyse der Deletionsmutanten durch zweidimensionale Gelelektrophorese, die Fusion der kälteinduzierten Gene mit *gfp* (*green fluorescent protein*) für die Fluoreszenzmikroskopie zur Lokalisation der kodierten Kälteschockproteine, und nicht zuletzt die Expression der Kälteschockgene zur Struktur und Funktionsaufklärung der gereinigten Proteine. Die dementsprechend erfolgten Untersuchungen sind in den folgenden Abschnitten beschrieben.

4.5 Untersuchung von *yplP* aus *B. subtilis* JH642



Nach der Transkriptionsanalyse durch die DNA Arrays ist das *yplP* Gen aus *B. subtilis* 70 min nach einem Kälteschock von 37°C auf 15°C 8,1-fach induziert. Dieses Ergebnis motiviert die weitere Untersuchung des Gens bezüglich seiner Rolle für die Kälteschockanpassung. Eine Datenbankanalyse durch BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) zeigte eine signifikante Homologie von YplP zu Transkriptionsregulatoren aus der *E. coli* NtrC/NifA Familie. *B. subtilis* hat insgesamt fünf Homologe dieser Familie von denen vier bislang beschrieben wurden (siehe Abbildung 4.5-1). Dazu gehören AcoR (31% Identität, 48% Ähnlichkeit) (Huang *et al.*, 1999), BkdR (32% Identität, 50% Ähnlichkeit) (Debarbouille *et al.*, 1999), LevR (25% Identität, 43% Ähnlichkeit) (Debarbouille *et al.*, 1991) und RocR (31% Identität, 47% Ähnlichkeit) (Calogero *et al.*, 1994). Allen gemeinsam ist die σ^L (σ^{54}) abhängige Transkriptionsaktivierung von Operons, die im Kohlehydratmetabolismus oder Aminosäurekatabolismus beteiligt sind.

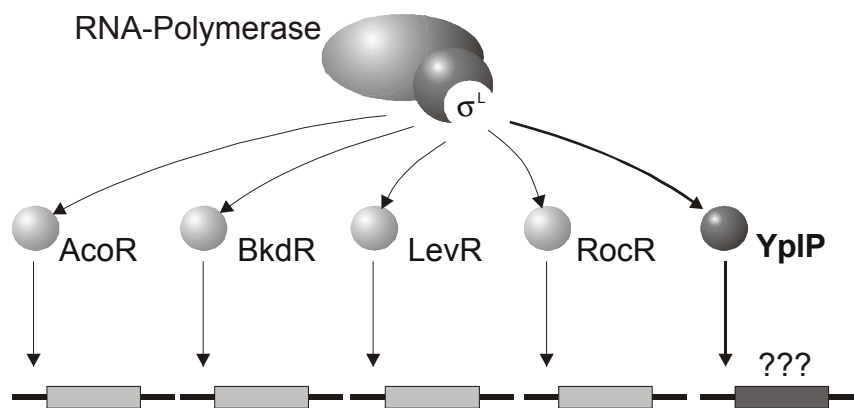


Abbildung 4.5-1 σ^L abhängige Transkriptionsaktivatoren in *B. subtilis*

Die durch die Aktivatoren regulierten Gene und Operons sind auf Grund ihrer Komplexität nicht in der schematischen Darstellung berücksichtigt worden.

Ein Sequenzvergleich von YplP zeigt sowohl die gut konservierte σ^{54} Interaktionsdomäne als auch ein C-terminales Bindemotiv (Daten nicht gezeigt). Dagegen fehlt in YplP die N-terminale Domäne, die in den anderen σ^L / σ^{54} Aktivatoren für die Signaltransduktion

verantwortlich ist (Shingler, 1996). Dies kann ein Indiz für eine vergleichsweise andere Regulation von YplP sein.

Eine *yplP* Deletionsmutante sollte Aufschluss über die Bedeutung des Gens erbringen. Zuvor sollte jedoch die aus den DNA Arrays ermittelte Kälteinduktion der Transkription durch einen Northernblot bestätigt werden.

4.5.1 Northernblotanalyse von *yplP*

Für die Northernblotanalyse von *yplP* aus *B. subtilis* wurden Kulturproben von *B. subtilis* JH642 vor und nach Kälteschock genommen. Dazu wurde *B. subtilis* JH642 in 200 mL SMM-Medium mit Isoleucin (5 µg/mL), Tryptophan (5 µg/mL), Phenylalanin (5 µg/mL), Glucose (0,5%) und Spurenelementen bei 37°C und 220 upm herangezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur sofort in einem vorgekühlten Wasserbad bei 15°C und 220 upm geschockt. Zwei Proben wurden entnommen, die jeweils 15 OD Zellen entsprachen (siehe Fußnote 2 Seite 59). Die erste Probe wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C und die zweite Probe 70 min nach Kälteschock bei 15°C entnommen. Die präparierte RNA wurde nach dem Blotten auf eine Membran mit einer digoxigeninmarkierten RNA Sonde gegen *yplP* hybridisiert, und das Transkriptionssignal mit Hilfe eines Fluoreszenzkits am Phosphoimager detektiert (siehe Abbildung 4.5-2). Als Ausgangsmaterial für die Sonde wurde ein DNA Fragment aus dem Strukturgen von *yplP* mit den Primern 5'*yplP*_Sonde und 3'*yplP*_Sonde+T7 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 mit PCR amplifiziert.

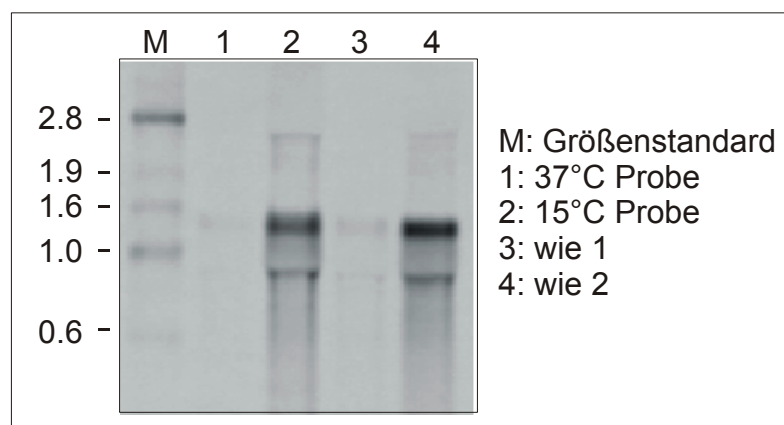


Abbildung 4.5-2 Northernblot von *yplP* aus *B. subtilis* vor und nach Kälteschock

Der Northernblot zeigt für die 37°C Proben nur sehr schwache Banden. Besser zu erkennen sind die deutlich stärkeren Banden der 15°C Proben, die der erwarteten Größe des Transkripts von *yplP* entsprechen. Die Kälteschockinduktion der Transkription von *yplP* aus *B. subtilis* ist

damit noch einmal gezeigt und bestätigt die Daten aus den DNA Arrays (siehe Abschnitt 4.3.2).

4.5.2 Konstruktion der *yplP* Deletionsmutante CB15

Die Konstruktion von CB15 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *yplP* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*Cla*I) und 3'*kan783*(*Cla*I) von dem Plasmid pDG783 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *Cla*I geschnitten und anschließend gereinigt. Die 5' und 3' flankierenden Regionen von *yplP* wurden durch eine PCR mit den Primern *yplP*-455(*Eco*RI) und *yplP*+1475(*Eco*RI) aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *Eco*RI geschnitten, gereinigt und in den ebenso geschnittenen pQE70 Vektor subkloniert. Das resultierende Plasmid pQE*yplP* wurde mit der Restriktionsendonuklease *Cla*I geschnitten, gereinigt und mit der Kanamycinkassette ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pCBΔ*yplP* wurde aus *E. coli* Top10 präpariert und nach Linearisierung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *yplP* mit PCR kontrolliert.

4.5.3 Wachstumseigenschaften der *yplP* Deletionsmutante CB15

Um zu sehen, welche Auswirkung die Deletion von *yplP* aus *B. subtilis* auf die Kälteanpassung hat, wurde von der *yplP* Deletionsmutante CB15 eine Wachstumskurve im Vergleich zum Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 in SMM-Medium aufgenommen, mit Isoleucin (5 µg/mL), Tryptophan (5 µg/mL), Phenylalanin (5 µg/mL), Glucose (0,5%) und Spurenelementen als Zusätze. Dazu wurden je 200 mL vorgewärmtes Medium mit einer 3 mL Übernachtskultur zu einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und im Wasserbad bei 37°C und 220 upm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde eine Hälfte der Kultur weiter bei 37°C geschüttelt und die andere Hälfte in einen zweiten Erlenmeyerkolben überführt und sofort in einem auf 15°C temperierten Wasserschüttler bei 220 upm inkubiert (siehe Abbildung 4.5-3).

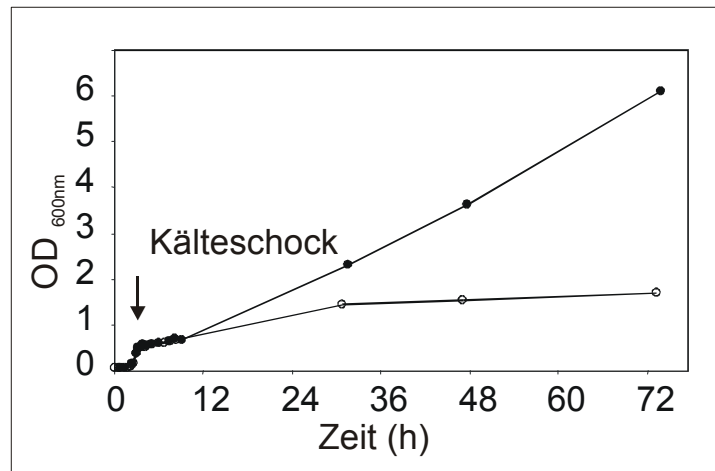


Abbildung 4.5-3 Wachstumskurve von *B. subtilis* JH642 und CB15 nach Kälteschock

B. subtilis JH642 (volle Kreise)
B. subtilis CB15 (offene Kreise)

Jede Wachstumskurve wurde zumindest drei mal wiederholt. Die Wachstumskurven zeigen im Vergleich zwischen *B. subtilis* JH642 und *yplP* Deletionsstamm CB15 nach Kälteschock einen signifikanten Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit. Die Deletion des Transkriptionsaktivators YpIP scheint sich negativ auf das Wachstum von *B. subtilis* bei 15°C auszuwirken. Folglich stellt sich die Frage, welche Gene durch YpIP reguliert werden, und was diese Gene für eine Rolle in der Kälteschockanpassung von *B. subtilis* spielen. Die Charakterisierung der *yplP* Deletionsmutante mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese erfolgte in Zusammenarbeit mit Frank Wiegeshoff im Rahmen einer Diplomarbeit (Wiegeshoff, 2003).

4.6 Untersuchung von *ylaG* aus *B. subtilis* JH642



Nach der Transkriptionsanalyse durch die DNA Arrays ist das *ylaG* Gen aus *B. subtilis* 70 min nach einem Kälteschock von 37°C auf 15°C 3,3-fach induziert. Eine Datenbankanalyse durch BLASTP (Altschul *et al.*, 1990) ergab für YlaG drei Domänen mit signifikanter Homologie zu GTP bindenden Elongationsfaktoren. Der N-Terminus dieser Proteinfamilie enthält typischer Weise die GTP bindende Domäne (P-loop Motiv). Der C-Terminus besteht aus zwei β -barrel Strukturen, von denen die erste an mit Aminosäuren beladene tRNAs bindet. Das von *ylaG* kodierte Protein hat 37% Identität (52% Ähnlichkeit)

zu EF-G und 30% Identität (45% Ähnlichkeit) mit EF-Tu aus *B. subtilis*. Da viele zuvor beschriebene Proteine (Graumann *et al.*, 1996), und ein großer Anteil der in dieser Arbeit identifizierten kälteinduzierten Gene mit ribosomalen Funktionen assoziiert sind, motivierte die Homologie zu den Elongationsfaktoren EF-G und EF-Tu zu Untersuchung einer Rolle von YlaG im Elongationsprozess bei niedrigen Temperaturen.

Eine *ylaG* Deletionsmutante sollte Aufschluss über die Bedeutung des Gens erbringen. Zuvor sollte jedoch die aus den DNA Arrays ermittelte Kälteinduktion der Transkription durch einen Northernblot bestätigt werden.

4.6.1 Northernblotanalyse von *ylaG*

Für die Northernblotanalyse von *ylaG* aus *B. subtilis* wurden Kulturproben von *B. subtilis* JH642 vor und nach Kälteschock genommen. Dazu wurde *B. subtilis* JH642 in 200 mL SMM-Medium mit Isoleucin (5 µg/mL), Tryptophan (5 µg/mL), Phenylalanin (5 µg/mL), Glucose (0,5%) und Spurenelementen bei 37°C und 220 upm herangezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde die Kultur sofort in einem vorgekühlten Wasserbad bei 15°C und 220 upm geschockt. Zwei Proben wurden entnommen, die jeweils 15 OD Zellen entsprachen (siehe Fußnote 2 Seite 59). Die erste Probe wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C und die zweite Probe 70 min nach Kälteschock bei 15°C entnommen. Die präparierte RNA wurde nach dem Blotten auf eine Membran mit einer Digoxigeninmarkierten RNA Sonde gegen *ylaG* hybridisiert, und das Transkriptionssignal mit Hilfe eines Fluoreszenzkits am Phosphoimager detektiert (siehe Abbildung 4.6-1). Als Ausgangsmaterial für die Sonde wurde ein DNA Fragment aus dem Strukturgen von *ylaG* mit den Primern 5'*ylaG*_Sonde und 3'*ylaG*_Sonde+T7 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 mit PCR amplifiziert.

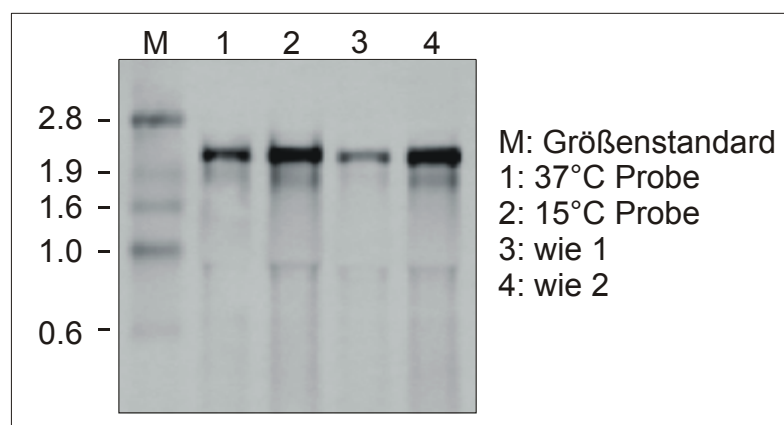


Abbildung 4.6-1 Northernblot von *ylaG* aus *B. subtilis* vor und nach Kälteschock

Der Northernblot zeigt für die 37°C Probe deutliche Banden, die der erwarteten Größe des Transkripts von *ylaG* entsprechen. Die Banden der 15°C Proben treten entsprechend der Induktion stärker hervor. Die Kälteschockinduktion der Transkription von *ylaG* aus *B. subtilis* ist damit noch einmal gezeigt und bestätigt die Daten aus den DNA Arrays (siehe Abschnitt 4.3.2).

4.6.2 Konstruktion der *ylaG* Deletionsmutante CB16

Die Konstruktion von CB16 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *ylaG* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*SpeI*) und 3'*kan783*(*SacII*) von dem Plasmid pDG783 amplifiziert und gereinigt. Die 5' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *ylaG*_P1 und *ylaG*_P2 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die 3' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *ylaG*_P3 und *ylaG*_P4 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die drei Fragmente wurden in einer PCR durch überhängende kompatible Primerenden miteinander verbunden. Das daraus resultierende Deletionsfragment wurde ohne Reinigung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *ylaG* mit PCR kontrolliert.

4.6.3 Wachstumseigenschaften der *ylaG* Deletionsmutante CB16

Das Wachstum der *ylaG* Deletionsmutante wurde, wie schon für CB15 beschrieben (siehe Abschnitt 4.5.3), mit dem Verhalten von *B. subtilis* JH642 bei 37°C und nach Kälteschock bei 15°C in SMM Minimalmedium verglichen. Es wurden in mehrfach wiederholten Versuchen keine signifikanten Unterschiede im Wachstum beobachtet (Abbildung 4.6-2). Folglich ist *ylaG* weder bei 37°C noch bei 15°C ein essentieller Wachstumsfaktor. Dieses Ergebnis überrascht insofern, da die 2D-Gel-Untersuchungen ebenfalls eine sehr starke Kälteinduktion von YlaG zeigen (siehe Abbildung 4.3-2).

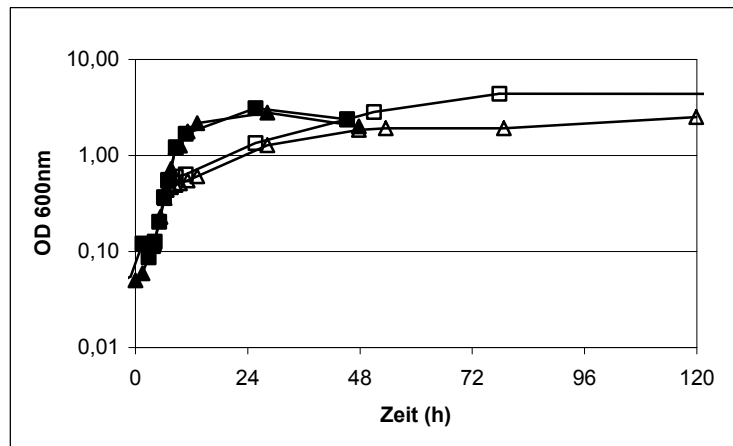


Abbildung 4.6-2 Wachstumskurve der *ylaG* Deletionsmutante CB16 bei 37°C und 15°C

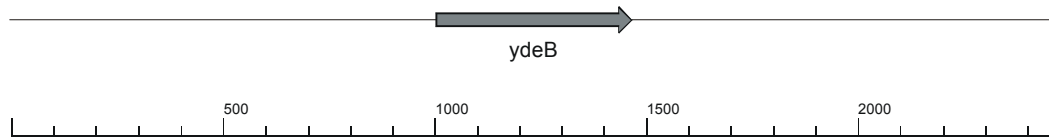
<i>B. subtilis</i> JH642 37°C	(volle Quadrate)	15°C	(offene Quadrate)
<i>B. subtilis</i> CB16 37°C	(volle Dreiecke)	15°C	(offene Dreiecke)

Die Charakterisierung der *ylaG* Deletionsmutante mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese erfolgte in Zusammenarbeit mit Frank Wiegeshoff im Rahmen einer Diplomarbeit (Wiegeshoff, 2003).

4.7 Untersuchung von *yorG* aus *B. subtilis* JH642

Nach der Transkriptionsanalyse durch die DNA Arrays ist das *yorG* Gen aus *B. subtilis* 70 min nach einem Kälteschock von 37°C auf 15°C 20,7-fach induziert. Aus einer Northernblotanalyse der Transkription von *yorG* vor und nach Kälteschock ging allerdings hervor, dass *yorG* nicht kalteinduziert ist (Daten nicht gezeigt). Der gemittelte Arraywert beruht auf einem Messfehler, denn nur einer der drei unabhängigen Parallelen der Arrays zeigt ein extrem starkes Signal für eine Transkription von *yorG* bei 15°C. Die anderen zwei 15°C Messwerte sind vergleichbar mit den drei für 37°C - also keine Veränderung nach Kälteschock. Das gemittelte Signal aus den drei Parallelen ergibt rechnerisch den falschen Messwert und die 20,7 fache Kälteinduktion. Eine *yorG* Deletionsmutante (*B. subtilis* CB17) wurde zwar in dieser Arbeit erstellt, aus gegebenen Gründen aber nicht weiter untersucht.

4.8 Untersuchung von *ydeB* aus *B. subtilis* JH642



Nach den Daten aus den DNA Arrays (siehe Abschnitt 4.3.2) gehört *ydeB* zu den stark kälteinduzierten Genen in *B. subtilis* JH642 (6,7 fach). Deshalb soll die Rolle von *ydeB* für die Kälteschockanpassung von *B. subtilis* untersucht werden. Eine Datenbankanalyse hat keine Homologien von *ydeB* zu anderen funktionell charakterisierten Genen ergeben. Möglicherweise erschließt sich die Funktion des *ydeB* Gens durch die Konstruktion und Charakterisierung einer *ydeB* Deletionsmutante.

4.8.1 Konstruktion der *ydeB* Deletionsmutante CB18

Die Konstruktion von CB18 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *ydeB* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783(NcoI)* und 3'*kan783(NcoI)* von dem Plasmid pDG783 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *NcoI* geschnitten und anschließend gereinigt. Die 5' und 3' flankierenden Regionen von *ydeB* wurden durch eine PCR mit den Primern *ydeB*-894(*SpeI*) und *ydeB*+1049(*SpeI*) aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *SpeI* geschnitten, gereinigt und in den ebenso geschnittenen pBlueskriptSK⁻ Vektor subkloniert. Das resultierende Plasmid pSK*ydeB* wurde mit der Restriktionsendonuklease *NcoI* geschnitten, gereinigt und mit der Kanamycinkassette ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pSKΔ*ydeB* wurde aus *E. coli* Top10 präpariert und nach Linearisierung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *ydeB* mit PCR kontrolliert.

4.8.2 Wachstumseigenschaften der *ydeB* Deletionsmutante CB18

Das Wachstum der *ydeB* Deletionsmutante wurde, wie schon für CB15 beschrieben (siehe Abschnitt 4.5.3), mit dem Verhalten von *B. subtilis* JH642 bei 37°C und nach Kälteschock bei 15°C in SMM Minimalmedium verglichen. Es wurden in mehrfach wiederholten Versuchen

keine signifikanten Unterschiede im Wachstum beobachtet (siehe Abbildung 4.8-1). Folglich ist *ydeB* weder bei 37°C noch bei 15°C ein essentieller Wachstumsfaktor.

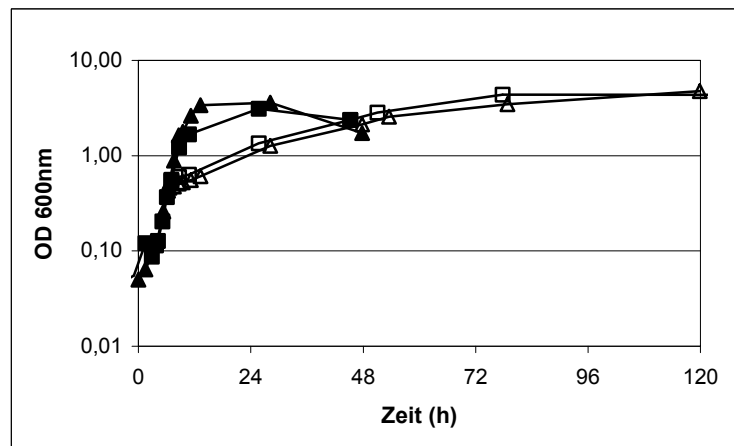
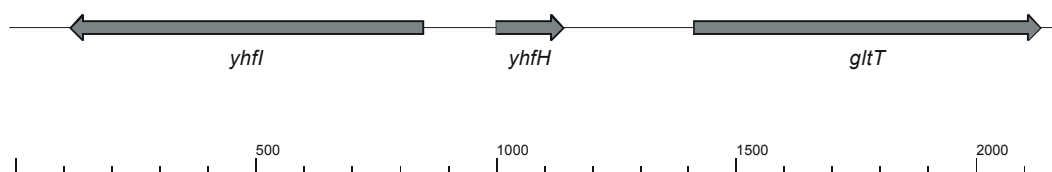


Abbildung 4.8-1 Wachstumskurve der *ydeB* Deletionsmutante CB18 bei 37°C und 15°C

<i>B. subtilis</i> JH642 37°C	(volle Quadrate)	15°C	(offene Quadrate)
<i>B. subtilis</i> CB18 37°C	(volle Dreiecke)	15°C	(offene Dreiecke)

Die Charakterisierung der *ydeB* Deletionsmutante mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese erfolgte in Zusammenarbeit mit Frank Wiegeshoff im Rahmen einer Diplomarbeit (Wiegeshoff, 2003).

4.9 Untersuchung von *yhfH* aus *B. subtilis* JH642



Nach den Daten aus den DNA Arrays (siehe Abschnitt 4.3.2) gehört *yhfH* zu den stark kälteinduzierten Genen in *B. subtilis* JH642 (14,7 fach). Deshalb soll die Rolle von *yhfH* für die Kälteschockanpassung von *B. subtilis* untersucht werden. Eine Datenbankanalyse hat keine Homologien von *yhfH* zu anderen funktionell charakterisierten Genen ergeben. Möglicherweise erschließt sich die Funktion des *yhfH* Gens durch die Konstruktion und Charakterisierung einer *yhfH* Deletionsmutante.

4.9.1 Konstruktion der *yhfH* Deletionsmutante CB19

Die Konstruktion von CB19 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA Fragment aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *yhfH* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783(NcoI)* und 3'*kan783(NcoI)* von dem Plasmid pDG783 amplifiziert und gereinigt. Die 5' und 3' flankierenden Regionen von *yhfH* wurden durch eine PCR mit den Primern *yhfH*-688(*EcoRI*) und *yhfH*+1001(*EcoRI*) aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* geschnitten, gereinigt und in den ebenso geschnittenen pBlueskriptSK⁻ Vektor subkloniert. Aus dem resultierenden Plasmid pSK*yhfH* wurde durch eine inverse PCR mit den Primern *yhfH*-11i(*NcoI*) und *yhfH*+203i(*NcoI*) ein DNA Fragment amplifiziert, dem der größte Teil des Strukturgens von *yhfH* fehlt. Das PCR Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease *NcoI* geschnitten, gereinigt und mit der Kanamycinkassette ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pSKΔ*yhfH* wurde aus *E. coli* Top10 präpariert und nach Linearisierung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *yhfH* mit PCR kontrolliert.

4.9.2 Wachstumseigenschaften der *yhfH* Deletionsmutante CB19

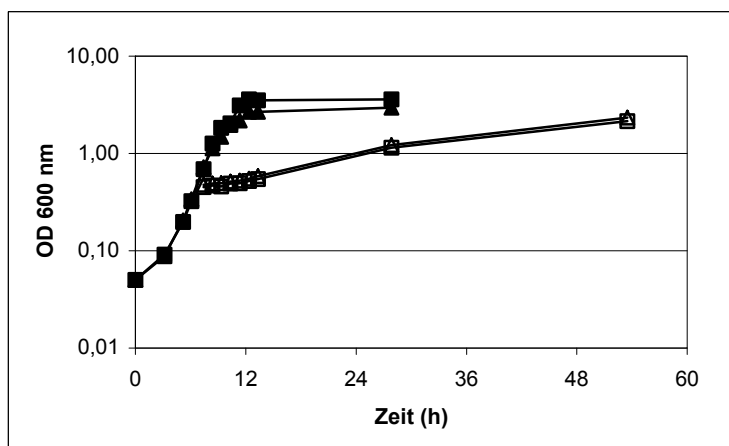


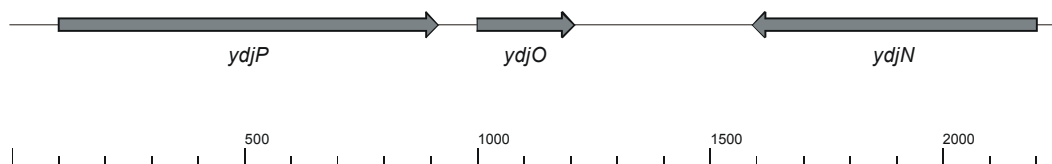
Abbildung 4.9-1 Wachstumskurve der *yhfH* Deletionsmutante CB19 bei 37°C und 15°C

<i>B. subtilis</i> JH642 37°C	(volle Quadrate)	15°C	(offene Quadrate)
<i>B. subtilis</i> CB19 37°C	(volle Dreiecke)	15°C	(offene Dreiecke)

Das Wachstum der *yhfH* Deletionsmutante wurde, wie schon für CB15 beschrieben (siehe Abschnitt 4.5.3), mit dem Verhalten von *B. subtilis* JH642 bei 37°C und nach Kälteschock bei 15°C in SMM Minimalmedium verglichen. Es wurden in mehrfach wiederholten Versuchen

keine signifikanten Unterschiede im Wachstum beobachtet (siehe Abbildung 4.9-1). Folglich ist *yhfH* weder bei 37°C noch bei 15°C ein essentieller Wachstumsfaktor. Die Charakterisierung der *yhfH* Deletionsmutante mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese erfolgte in Zusammenarbeit mit Frank Wiegeshoff im Rahmen einer Diplomarbeit (Wiegeshoff, 2003).

4.10 Untersuchung von *ydjO* aus *B. subtilis* JH642



Nach den Daten aus den DNA Arrays (siehe Abschnitt 4.3.2) gehört *ydjO* zu den stark kälteinduzierten Genen in *B. subtilis* JH642 (6,2 fach). Deshalb soll die Rolle von *ydjO* für die Kälteschockanpassung von *B. subtilis* untersucht werden. Eine Datenbankanalyse hat keine Homologien von *ydjO* zu anderen funktionell charakterisierten Genen ergeben. Möglicherweise erschließt sich die Funktion des *ydjO* Gens durch die Konstruktion und Charakterisierung einer *ydjO* Deletionsmutante.

4.10.1 Konstruktion der *ydjO* Deletionsmutante CB20

Die Konstruktion von CB20 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA Fragment aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *ydjO* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783(NcoI)* und 3'*kan783(NcoI)* von dem Plasmid pDG783 amplifiziert und gereinigt. Die 5' und 3' flankierenden Regionen von *ydjO* wurden durch eine PCR mit den Primern *ydjO*-891(*EcoRI*) und *ydjO*+536(*EcoRI*) aus chromosomaler DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert, mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* geschnitten, gereinigt und in den ebenso geschnittenen pBlueskriptSK⁻ Vektor subkloniert. Aus dem resultierenden Plasmid pSK*ydjO* wurde durch eine inverse PCR mit den Primern *ydjO*-20i(*NcoI*) und *ydjO*+9i(*NcoI*) ein DNA Fragment amplifiziert, dem der größte Teil des Strukturgens von *ydjO* fehlt. Das PCR Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease *NcoI* geschnitten, gereinigt und mit der Kanamycinkassette ligiert. Das daraus resultierende Plasmid pSKΔ*ydjO* wurde aus *E. coli* Top10 präpariert und nach Linearisierung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der

Resistenzkassette auf DSM Kan Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *ypIP* mit PCR kontrolliert.

4.10.2 Wachstumseigenschaften der *ydjO* Deletionsmutante CB20

Das Wachstum der *ydjO* Deletionsmutante wurde, wie schon für CB15 beschrieben (siehe Abschnitt 4.5.3), mit dem Verhalten von *B. subtilis* JH642 bei 37°C und nach Kälteschock bei 15°C in SMM Minimalmedium verglichen. Es wurde in mehrfach wiederholten Versuchen keine signifikanten Unterschiede im Wachstum beobachtet (siehe Abbildung 4.10-1). Folglich ist *ydjO* weder bei 37°C noch bei 15°C ein essentieller Wachstumsfaktor.

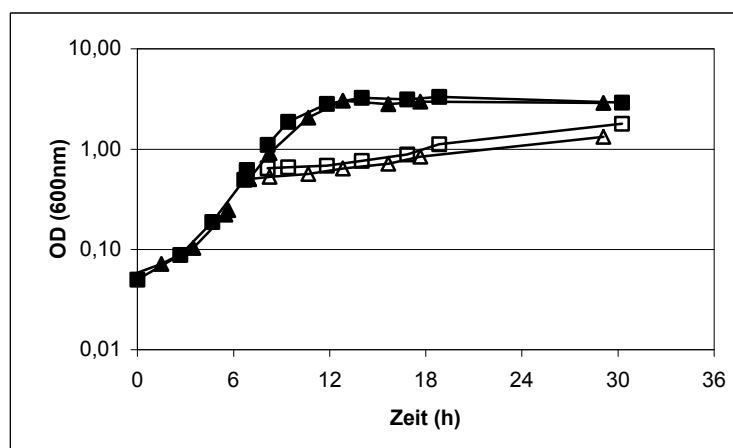
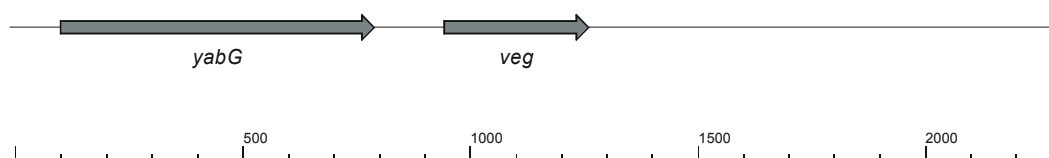


Abbildung 4.10-1 Wachstumskurve der *ydjO* Deletionsmutante CB20 bei 37°C und 15°C

<i>B. subtilis</i> JH642 37°C	(volle Quadrate)	15°C	(offene Quadrate)
<i>B. subtilis</i> CB20 37°C	(volle Dreiecke)	15°C	(offene Dreiecke)

Die Charakterisierung der *ydjO* Deletionsmutante mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese erfolgte in Zusammenarbeit mit Frank Wiegshoff im Rahmen einer Diplomarbeit (Wiegshoff, 2003).

4.11 Untersuchung von *veg* aus *B. subtilis* JH642



Nach den Daten aus den DNA Arrays (siehe Abschnitt 4.3.2) gehört *veg* zu den stark kälteinduzierten Genen in *B. subtilis* JH642 (6,2 fach). Deshalb soll die Rolle von *veg* für die Kälteschockanpassung von *B. subtilis* untersucht werden.

4.11.1 Konstruktion der *veg* Deletionsmutante CB21

Die Konstruktion von CB21 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *veg* mit einer Kanamycinkassette dazwischen. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*SpeI*) und 3'*kan783*(*SacII*) von dem Plasmid pDG783 amplifiziert und gereinigt. Die 5' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *veg_P1* und *veg_P2* aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die 3' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *veg_P3* und *veg_P4* aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die drei Fragmente wurden in einer PCR durch überhängende kompatible Primerenden miteinander verbunden. Das daraus resultierende Deletionsfragment wurde ohne Reinigung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *veg* mit PCR kontrolliert.

4.11.2 Wachstumseigenschaften der *veg* Deletionsmutante CB21

Das Wachstum der *veg* Deletionsmutante wurde, wie schon für CB15 beschrieben (siehe Abschnitt 4.5.3), mit dem Verhalten von *B. subtilis* JH642 bei 37°C und nach Kälteschock bei 15°C in SMM Minimalmedium verglichen. Es wurden in mehrfach wiederholten Versuchen keine signifikanten Unterschiede im Wachstum beobachtet (siehe Abbildung 4.11-1). Folglich ist *veg* weder bei 37°C noch bei 15°C ein essentieller Wachstumsfaktor.

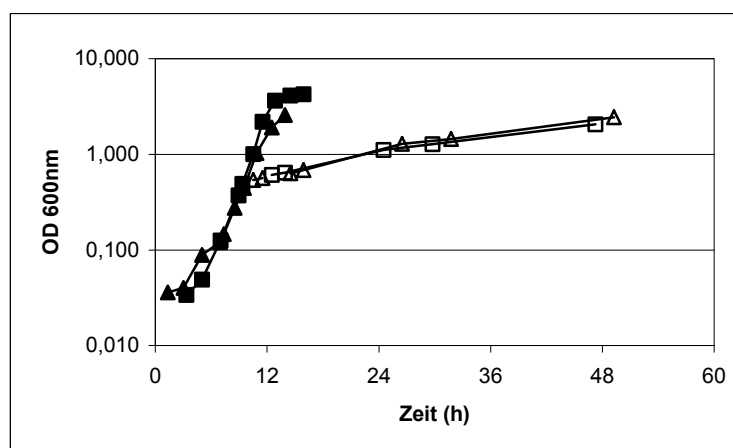


Abbildung 4.11-1 Wachstumskurve der *veg* Deletionsmutante CB21 bei 37°C und 15°C

<i>B. subtilis</i> JH642 37°C	(volle Quadrate)	15°C	(offene Quadrate)
<i>B. subtilis</i> CB21 37°C	(volle Dreiecke)	15°C	(offene Dreiecke)

4.12 Untersuchung der DEAD-Box Helikasen YdbR und YqfR

Entsprechend den Daten aus der genomweiten Transkriptionsanalyse (siehe Abschnitt 4.3.2) sind die Gene *ydbR* und *yqfR* aus *B. subtilis* JH642 2,6-fach und 2,3-fach kälteinduziert. Dieser Induktionsfaktor ist nicht so hoch wie bei den vorausgehend untersuchten Genen (siehe Abschnitte 4.5-4.11), ist aber dennoch statistisch signifikant. Darüber hinaus fiel die Wahl zur Untersuchung gerade auf diese beiden Gene, weil ein Sequenzvergleich mit einer Datenbank Homologien zu bereits bekannten kälteinduzierten Genen ergab, die zur Familie der DEAD-Box Helikasen gehören.

4.12.1 Identifizierung der DEAD-Box Helikasen YdbR und YqfR

Die Familie der DEAD-Box Helikasen zeichnet sich durch eine zentrale Domäne mit acht konservierten Sequenzmotiven aus (siehe Abschnitt 1.2.2.1). Eine Datenbanksuche mit dem BLAST Programm (Altschul *et al.*, 1990) der zentralen Domäne von YdbR und YqfR ergab eine hohe Identität zu den bereits bekannten kälteinduzierten DEAD-Box Helikasen CsdA aus *E. coli* (Jones *et al.*, 1996), ChrC aus dem Cyanobakterium *Anabaena* (Chamot *et al.*, 1999) und DeaD aus dem Archaea *M. burtonii* (Lim *et al.*, 2000) (siehe Tabelle 4.12-1). Die transkriptionell etwas stärker induzierte Helikase YdbR zeigt durchweg höhere Homologien zu den anderen kälteinduzierten Helikasen.

YdbR	YqfR	
51,3 %	37,0 %	CsdA <i>E. coli</i>
44,0 %	33,0 %	ChrC <i>Anabaena</i> sp.
49,0 %	37,7 %	DeaD <i>M. burtonii</i>
x	39,7 %	YdbR <i>B. subtilis</i>
39,7 %	x	YqfR <i>B. subtilis</i>

Tabelle 4.12-1: Sequenzidentität der zentralen Domäne von DEAD-Box Proteinen

Die acht konservierten Motive der DEAD-Box Helikasen treten bei dem Sequenzvergleich besonders stark hervor (siehe Abbildung 4.12-1). Das erste Motiv ist ein Walker A Motiv und das fünfte stellt eine modifizierte Form des Walker B Motivs dar (Walker *et al.*, 1982), die beide an der ATP Bindung und Hydrolyse beteiligt sind (Luking *et al.*, 1998).

Die N-terminale und die C-terminale Domäne von YdbR und YqfR weisen keine signifikante Übereinstimmung mit den anderen kälteinduzierten Helikasen auf. Die Unähnlichkeit dieser Domänen ist allerdings ein allgemeines Merkmal der Familie der Helikasen (siehe Abschnitt 1.2.2.1) und kann deshalb generell nicht zu deren Einordnung verwendet werden.

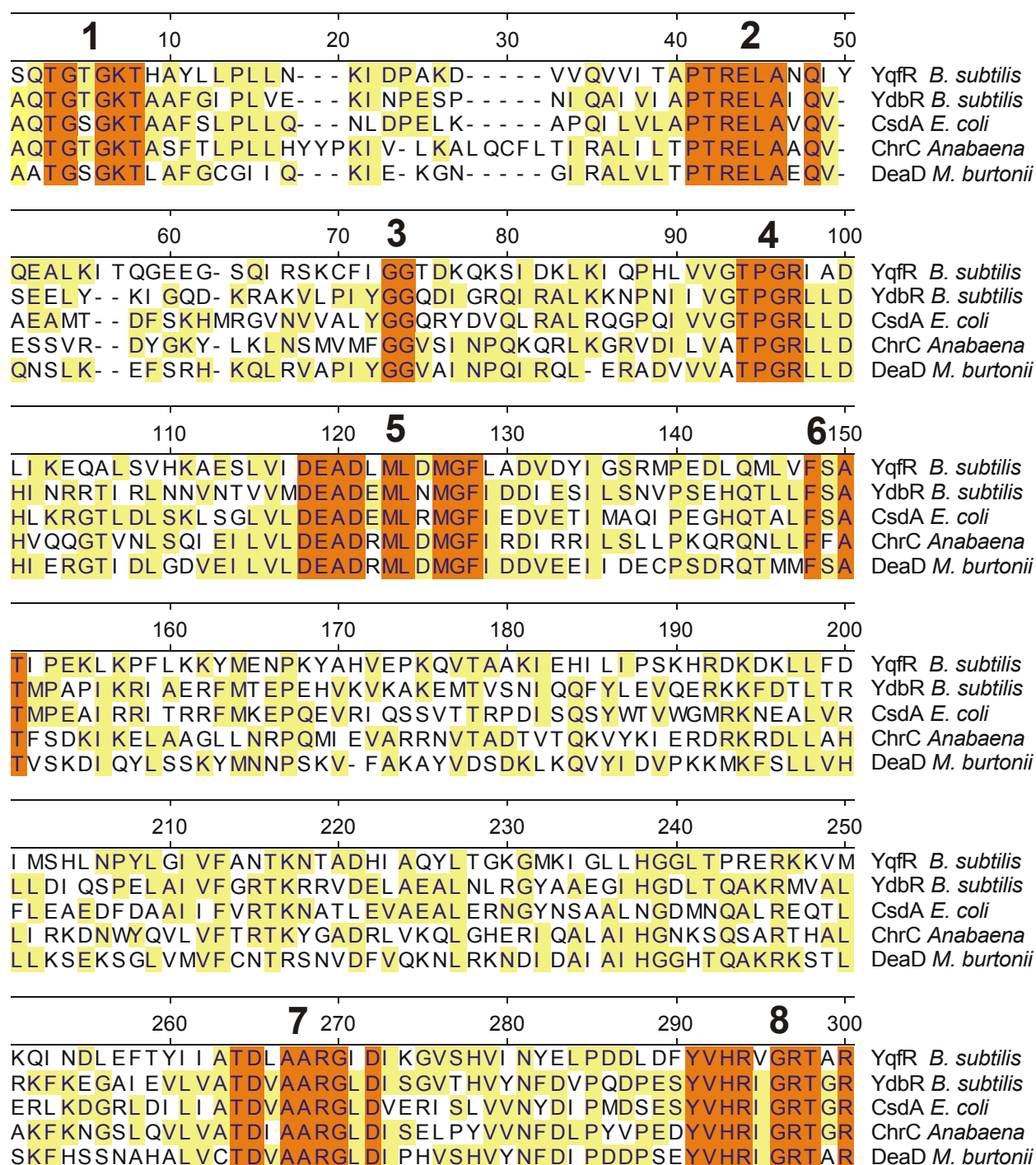


Abbildung 4.12-1 Sequenzvergleich der konservierten zentralen Helikasedomäne

Gelb: Konsensussequenz
 Orange: die acht spezifischen DEAD-Box Helikasemotive

4.12.2 Sequenzuntersuchung des 5' untranslatierten Bereichs von YdbR und YqfR

Der 5' untranslatierte Bereich von Genen kann Informationen z.B. für die Regulation der Gene enthalten. Ein Beispiel dafür ist das *cold-box* Element in der 5'untranslatierten Region der kälteinduzierten CSP (siehe Abschnitt 1.2.1). Dieser in mehreren Organismen identifizierten Sequenz, z.B. in *E. coli* und *B. subtilis*, wird eine Rolle in der Regulation der CSP zugeschrieben (Graumann *et al.*, 1998; Phadtare *et al.*, 1999a). Die endgültige Bestimmung der Funktion steht allerdings noch aus. Das *cold-box* Element wurde schließlich auch im 5'untranslatierten Bereich von kälteinduzierten DEAD-Box Helikasen gefunden (Lim *et al.*, 2000). Es stellte sich deshalb die Frage, ob diese Sequenz auch bei YdbR und YqfR zu finden ist. Ein Sequenzvergleich ergab, dass auch die kälteinduzierten Helikasen aus *B. subtilis* im 5'untranslatierten Bereich signifikante Übereinstimmung mit dem *cold-box* Element aufweisen (siehe Abbildung 4.12-2). Auch wenn die Funktion dieser konservierten Sequenz noch nicht eindeutig geklärt ist, so scheint sie zumindest ein gemeinsames Merkmal der CSP und der kälteinduzierten Helikasen zu sein.

TGAATAAAACA	<i>yqfR</i>	<i>B. subtilis</i>
TGAAAAACAAA	<i>ydbR</i>	<i>B. subtilis</i>
TGACGTACACA	<i>csdA</i>	<i>E. coli</i>
TGACATACAAA	<i>deaD</i>	<i>M. burtonii</i>
TGACAGGCCGA	<i>chrC</i>	<i>Anabaena</i>
TGAAGAACAGA	<i>cspB</i>	<i>E. coli</i>
TGACGTACAGA	<i>cspA</i>	<i>E. coli</i>

Abbildung 4.12-2 Sequenzvergleich des *cold-box* Elements von Helikasen und CSP

Grau: Konsensussequenz

Die Sequenzhomologien von YdbR und YqfR aus *B. subtilis* zu den kälteinduzierten DEAD-Box Helikasen aus *E. coli*, *Anabaena* und *M. burtonii*, sowie die Identifizierung einer putativen *cold-box* im 5'untranslatierbaren Bereich waren der Anlass für weitergehende Untersuchungen. Dazu wurden zunächst Deletionsmutanten von *yqfR* und *ydbR* konstruiert.

4.12.3 Konstruktion der *ydbR* Deletionsmutante CB30

Die Konstruktion von CB30 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *ydbR* mit einer Chloramphenicolkassette dazwischen. Die Chloramphenicolkassette wurde mit den Restriktionsendonukleasen *SpeI* und *PstI* aus dem Plasmid pΔTE herausgeschnitten und gereinigt. Die 5' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *ydbR*_P1 und *ydbR*_P2 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die 3' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *ydbR*_P3 und *ydbR*_P4 aus

der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die drei Fragmente wurden in einer PCR durch überhängende kompatible Primerenden miteinander verbunden. Das daraus resultierende Deletionsfragment wurde ohne Reinigung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Cm Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *ydbR* mit PCR kontrolliert.

4.12.4 Konstruktion der *yqfR* Deletionsmutante CB40

Die Konstruktion von CB40 erfolgte über die Transformation von *B. subtilis* JH642 mit einem DNA Konstrukt aus den 5' und 3' flankierenden Regionen von *yqfR* mit einer Erythromycinkassette dazwischen. Die Erythromycinkassette wurde mit der Restriktionsendonuklease *Bam*HI aus dem Plasmid pDG646 herausgeschnitten und gereinigt. Die 5' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *yqfR* _P1 und *yqfR* _P2 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die 3' flankierende Region wurde durch eine PCR mit den Primern *yqfR* _P3 und *yqfR* _P4 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und gereinigt. Die drei Fragmente wurden in einer PCR durch überhängende kompatible Primerenden miteinander verbunden. Das daraus resultierende Deletionsfragment wurde ohne Reinigung für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Ery/Lin Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *yqfR* mit PCR kontrolliert.

4.12.5 Wachstum der *ydbR* und *yqfR* Deletionsmutanten CB30 und CB40

Um zu sehen, welche Auswirkung die Deletion von *ydbR* bzw. *yqfR* aus *B. subtilis* auf die Kälteanpassung hat, wurde von der *ydbR* Deletionsmutante CB30 und der *ydbR* Deletionsmutante CB40 eine Wachstumskurve im Vergleich zum Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 in SMM-Medium aufgenommen, mit Isoleucin (5 µg/mL), Tryptophan (5 µg/mL), Phenylalanin (5 µg/mL), Glucose (0,5%) und Spurenelementen als Zusätze. Dazu wurden je 200 mL vorgewärmtes Medium mit einer 3 mL Übernachtskultur zu einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und im Wasserbad bei 37°C und 220 upm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde eine Hälfte der Kultur weiter bei 37°C geschüttelt und die andere Hälfte in einen zweiten Erlenmeyerkolben überführt und sofort in einem auf 15°C temperierten Wasserschüttler bei 220 upm inkubiert (siehe Abbildung 4.12-3).

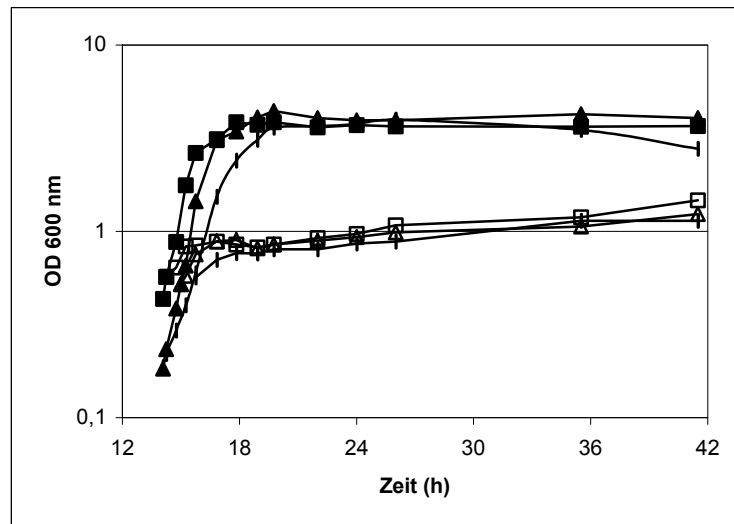


Abbildung 4.12-3 Wachstum von CB30 und CB40 bei 37°C und 15°C

<i>B. subtilis</i> JH642 37°C	(volle Quadrate)	15°C	(offene Quadrate)
<i>B. subtilis</i> CB30 37°C	(volle Dreiecke)	15°C	(offene Dreiecke)
<i>B. subtilis</i> CB40 37°C	(volle Rauten)	15°C	(offene Rauten)

Das Wachstum der beiden *ydbR* und *yqfR* Deletionsmutanten CB30 und CB40 ist bei 37°C gut mit dem Wachstum des Kontrollstamms *B. subtilis* JH642 vergleichbar. Allerdings ist das Verhalten der beiden Deletionsmutanten auch nach Kälteschock von 37°C auf 15°C wie das von *B. subtilis* JH642. In wiederholten Wachstumsexperimenten konnte weder für CB30 noch CB40 eine signifikante Abweichung vom Kontrollstamm nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist eine funktionelle Überlappung der beiden mRNA-Helikasen YdbR und YqfR. Es ist möglich, dass eine kälteinduzierte Helikase für das Wachstum bei 15°C ausreichend ist, wenn die verbliebene Helikase die jeweils deletierte funktionell komplementiert. Als Konsequenz aus dieser Möglichkeit sollte eine *ydbR yqfR* Doppelmutante konstruiert werden (siehe Abschnitt 4.12.6). Die Charakterisierung der *ydbR* und der *yqfR* Deletionsmutanten CB30 und CB40 mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese erfolgte in Zusammenarbeit mit Frank Wiegeshoff im Rahmen einer Diplomarbeit (Wiegeshoff, 2003).

4.12.6 Konstruktion einer *ydbR yqfR* Doppelmutante

In der Untersuchung der beiden *ydbR* und *yqfR* Deletionsmutanten CB30 und CB40 konnte auf Grund möglicher Komplementation der jeweils verbliebenen mRNA Helikase kein Wachstumsdefekt nach Kälteschock gezeigt werden (siehe Abschnitt 4.12.5). Ein bekanntes Beispiel für diese Möglichkeit ist das Verhalten der drei homologen CSP CspB, CspC und CspD aus *B. subtilis* (siehe 1.2.1). Ein einziges CSP reicht für das Wachstum aus und erst die

Deletion des letzten CSP ist für *B. subtilis* lethal, dann aber auch schon unter optimalen Wachstumsbedingungen (Graumann *et al.*, 1997). Konsequenter Weise sollte eine *ydbR yqfR* Doppelmutante konstruiert werden, die dann nicht mehr die Möglichkeit der funktionellen Komplementation durch eine kälteinduzierte mRNA Helikase hätte. Dementsprechend könnte für eine Doppelmutante ein Wachstumsdefekt nachgewiesen werden oder wie im Fall der CSP könnte sich die Doppeldeletion auch als essentiell erweisen.

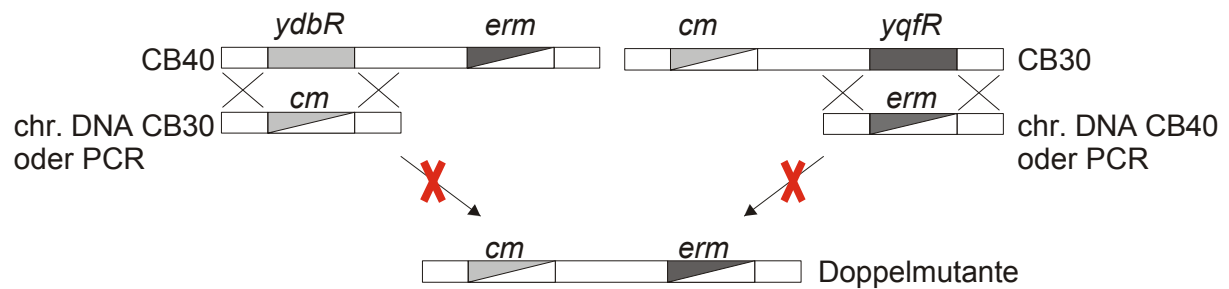


Abbildung 4.12-4 Strategie zur Konstruktion einer *ydbR yqfR* Doppelmutante

Dazu wurde zunächst die chromosomale DNA aus den Stämmen CB30 und CB40 isoliert, die jeweils eine Deletion der Helikasegene *ydbR* bzw. *yqfR* tragen. Anschließend wurden die Stämme CB30 und CB40 mit der chromosomalen DNA des jeweils anderen Stammes transformiert und der Transformationsansatz auf DSM Platten, die zur Selektion sowohl Chloramphenicol (*ydbR::cm*) als auch Erythromycin und Lincomycin (*yqfR::erm*) enthielten, ausplattiert (siehe Abbildung 4.12-4). Trotz mehrfacher Wiederholung dieser Transformationen, mit entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen der Kompetenz und Integrität der verwendeten Stämme, wurde in keinem Fall die Doppelmutante erhalten. Auch die Transformation der Stämme CB30 und CB40 mit PCR Amplifikaten aus chromosomaler DNA von CB30 und CB40 mit flankierenden Bereichen von *ydbR* bzw. *yqfR* und Resistenzkassette d.h. *ydbR::cm* bzw. *yqfR::erm* führten nicht zum gewünschten Erfolg. Weil alle Kontrollen dieser Experimente den Erwartungen entsprachen, ist eine mögliche Erklärung für den Misserfolg der Transformationsexperimente, dass die Deletion beider kälteinduzierten mRNA-Helikasen für *B. subtilis* JH642 lethal ist, wie es auch schon für die CSP aus *B. subtilis* gezeigt wurde (Graumann *et al.*, 1997). Auf Grund dieser Ergebnisse wurde geplant, eine Doppelmutante mit einer zusätzlichen induzierbaren Kopie einer der beiden Helikasegene zu konstruieren (siehe Abschnitt 4.12.7).

4.12.7 Konstruktion der induzierbaren *ydbR yqfR* Doppelmutante CB3441

Eine Doppelmutante von *ydbR* und *yqfR* aus *B. subtilis* JH642 konnte auf direktem Weg nicht konstruiert werden (siehe Abschnitt 4.12.6). Um dennoch zeigen zu können welche Auswirkung die Deletion beider Gene *ydbR* und *yqfR* auf das Wachstum von *B. subtilis* hat, wurde eine induzierbare Doppelmutante konstruiert. Für diesen Zweck wurde zunächst eine Kopie von *yqfR* *in trans* unter die Kontrolle eines durch Xylose induzierbaren Promotors (P_{xyl}) gestellt, um die anschließende Deletion der beiden Helikasegene *ydbR* und *yqfR* unter Induktionsbedingungen zu ermöglichen (siehe Abbildung 4.12-5).

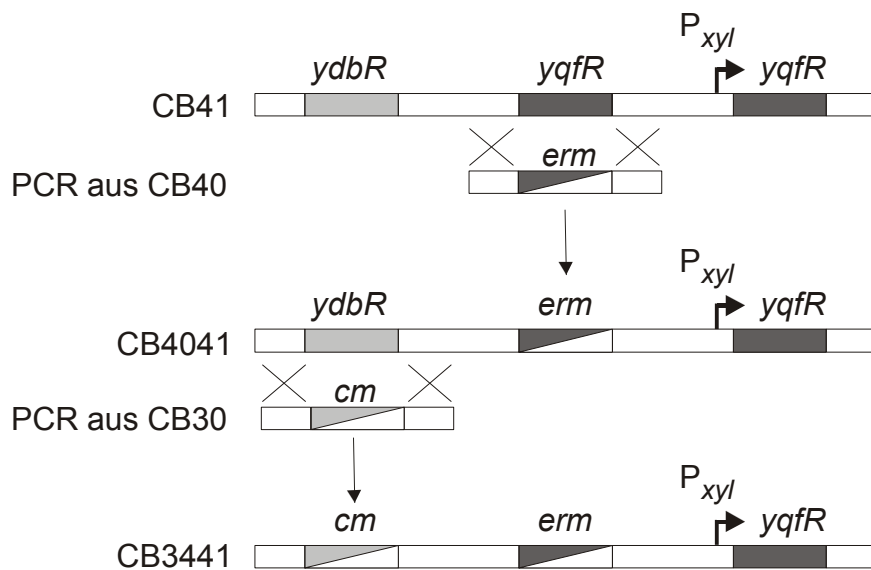


Abbildung 4.12-5 Konstruktion der induzierbaren *ydbR yqfR* Doppelmutante CB3441

4.12.7.1 Konstruktion von CB41:

Zunächst wurde der Stamm CB41 konstruiert, der durch Transformation von *B. subtilis* JH642 mit dem pX Integrationsvektor für den *amyE* Locus hervorgegangen ist, der das *yqfR* Gen unter Kontrolle eines durch Xylose induzierbaren Promotors enthält. Weil das *ydbR* Gen schon mit Hilfe der Chloramphenicolresistenz deletiert wurde (siehe Abschnitt 4.12.3), musste die Chloramphenicolkassette des pX Integrationsvektors erst gegen eine Kanamycinkassette ausgetauscht werden. Die Kanamycinkassette wurde durch eine PCR mit den Primern 5'*kan783*(*SpeI*) und 3'*kan783*(*SphI*)II von dem Plasmid pDG783 amplifiziert, gereinigt und an beiden Enden mit der Restriktionsendonuklease *SphI* geschnitten. Der Primer 3'*kan783*(*SphI*)II (nicht zu verwechseln mit 3'*kan783*(*SphI*)) liegt zwischen dem *kan* Gen und der MCS, so dass die *Bam*HI Schnittstelle von pDG783 wegfällt, die für die Klonierung in pX wichtig ist. Aus dem pX Vektor wurde die Chloramphenicolkassette durch Verdau mit der Restriktionsendonuklease *SphI* entfernt und der geschnittene Vektor mit der Kanamycin-

kassette ligiert, um den modifizierten Integrationsvektor pXkan zu ergeben. Das *yqfR* Gen wurde durch eine PCR mit den Primern *yqfR5'*pX(*SpeI*) und *yqfR3'*pX(*BamHI*) aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert, mit den Restriktionsendonuklease *SpeI* und *BamHI* verdaut und mit dem ebenso geschnittenen pXkan Vektor ligiert. Der resultierende Integrationsvektor pXkan_*yqfR* wurde nach Linearisierung mit *SexAI* für die Transformation von *B. subtilis* JH642 verwendet. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Integration von P_{xy}/*yqfR* mit PCR kontrolliert.

4.12.7.2 Konstruktion von CB4041:

Der Stamm CB4041 wurde durch die Transformation des Stammes CB41 mit einer PCR aus der *yqfR* Deletionsmutante CB40 konstruiert (siehe Abbildung 4.12-5). Die PCR für das Deletionsfragment wurde mit den Primern *yqfR_P1* und *yqfR_P4* aus der chromosomalen DNA von CB40 amplifiziert und enthält die 5' und 3' flankierenden Bereichen von *yqfR* mit der Erythromycinkassette dazwischen. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf DSM Kan/Ery/Lin Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *yqfR* mit PCR kontrolliert.

4.12.7.3 Konstruktion von CB3441

Der Stamm CB3441 wurde durch die Transformation des Stammes CB4041 mit einer PCR aus der *ydbR* Deletionsmutante CB30 konstruiert (siehe Abbildung 4.12-5). Die PCR für das Deletionsfragment wurde mit den Primern *ydbR_P1* und *ydbR_P4* aus der chromosomalen DNA von CB40 amplifiziert und enthält die 5' und 3' flankierenden Bereiche von *ydbR* mit der Chloramphenicolkassette dazwischen. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf die Integration der Resistenzkassette auf xylosehaltige DSM Kan/Cm Platten ausplattiert und die erhaltenen Transformanten auf die erfolgreiche Deletion von *ydbR* mit PCR kontrolliert.

Im Gegensatz zu dem misslungenen Versuch die Doppelmutante direkt herzustellen, ist der Ansatz über die Deletion nach Einfügen einer induzierbaren Kopie von *yqfR in trans* sofort gelungen. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass die Doppeldeletion von *ydbR* und *yqfR* lethal sein könnte.

4.12.8 Wachstum der induzierbaren *ydbR yqfR* Doppelmutante CB3441

Ohne den Induktor Xylose sollte die induzierbare *ydbR yqfR* Doppelmutante CB3441 wie eine echte Doppelmutante wachsen, die so nicht direkt herzustellen war (siehe Abschnitt 4.12.6). Anders als in den Einzelmutanten der mRNA-Helikasen CB30 und CB40, sollte es

möglich sein das Verhalten von *B. subtilis* nach Kälteschock von 37°C auf 15°C zu beobachten, wenn keine kälteinduzierten Helikasen mehr produziert werden.

Weil Glucose den Xylosepromotor durch Katabolitrepression unterdrückt, wurden sie im Medium durch Fruktose als C-Quelle ersetzt. Das Wachstum der induzierbaren Doppelmutante CB3441 wurde im Vergleich zum Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 in SMM-Medium aufgenommen, mit Isoleucin (5 µg/mL), Tryptophan (5 µg/mL), Phenylalanin (5 µg/mL), Fruktose (0,5%) und Spurenelementen als Zusätze. Dazu wurden je 200 mL vorgewärmtes Medium mit einer 3 mL Übernachtskultur zu einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und im Wasserbad bei 37°C und 220 upm inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurde eine Hälfte der Kultur weiter bei 37°C geschüttelt und die andere Hälfte in einen zweiten Erlenmeyerkolben überführt und sofort in einem auf 15°C temperierten Wasserschüttler bei 220 upm inkubiert (siehe Abbildung 4.12-6).

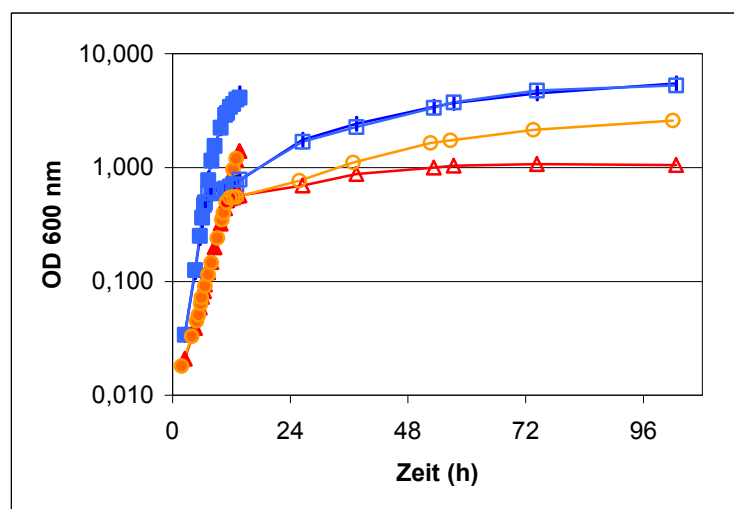


Abbildung 4.12-6 Wachstumskurve der induzierbaren *ydbR yqfR* Doppelmutante CB3441

<i>B. subtilis</i> JH642 37°C	(volle Rauten)	15°C	(offene Rauten)
<i>B. subtilis</i> JH642 37°C +Xylose	(volle Quadrate)	15°C +Xylose	(offene Quadrate)
<i>B. subtilis</i> CB3441 37°C	(volle Dreiecke)	15°C	(offene Dreiecke)
<i>B. subtilis</i> CB3441 37°C +Xylose	(volle Kreise)	15°C +Xylose	(offene Kreise)

Zunächst sollte der Einfluss des Mediums mit und ohne den Induktor Xylose auf das Wachstum des Kontrollstammes *B. subtilis* JH642 bei 37°C und nach Kälteschock bei 15°C getestet werden. Wie aus Abbildung 4.12-6 hervorgeht ist kein Unterschied im Wachstum von *B. subtilis* JH642 mit und ohne Xylose festzustellen. Damit ist der direkte Vergleich aller Wachstumskurven gerechtfertigt.

Als nächstes sollte das Wachstum der Mutante CB3441 mit dem Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 bei 37°C verglichen werden. Aus Abbildung 4.12-6 geht hervor, dass zwar die

Verdopplungszeit von CB3441 um den Faktor zwei langsamer ist, als die von *B. subtilis* JH642, dass aber auch hier der Induktor Xylose keinen offensichtlichen Einfluss auf das Wachstum der Mutante bei 37°C hat. Wenn die mRNA-Helikasen zur Kälteadaptation dienen, ist auch nicht davon auszugehen, dass ihre Expression einen großen Unterschied auf das Wachstum der Mutante CB3441 bei 37°C bewirkt.

Schließlich sollte das Wachstum der Induzierten Mutante CB3441 mit dem der nicht induzierten nach Kälteschock von 37°C auf 15°C verglichen werden. Falls die mRNA-Helikasen eine wichtige Rolle für die Kälteanpassung von *B. subtilis* spielen sollten, wäre ein Wachstumsunterschied nach Kälteschock zu erwarten. Aus Abbildung 4.12-6 geht genau dies hervor, die nicht induzierte Mutante scheint nach einer langsamen Wachstumsphase nach Kälteschock auf 15°C sogar zu stagnieren, d.h. nach einer Verdopplung von OD 0,5 auf 1,0, während die induzierte Mutante weiter wächst. Dieses Ergebnis deutet auf eine wichtige Rolle der mRNA-Helikasen für die Kälteadaptation von *B. subtilis* JH642 hin. Allerdings geht aus diesem Experiment nicht hervor, dass die fehlende Expression beider mRNA-Helikasen für *B. subtilis* lethal ist, wie es die Transformationsexperimente angedeutet haben. Falls aber der durch Xylose induzierbare Promotor auch ohne Induktor durchlässig ist, könnte dies ausreichen, um das Wachstum der nicht induzierten Mutante bei 15°C zu gewährleisten. Diese Möglichkeit soll durch eine Transkriptionsanalyse getestet werden (siehe Abschnitt 4.12.9).

4.12.9 Northernblotanalyse der induzierbaren *ydbR yqfR* Doppelmutante CB3441

Das Wachstumsexperiment der induzierbaren *ydbR yqfR* Doppelmutante CB3441 zeigt, dass dieser Stamm nach Kälteschock auf 15°C ohne Induktion durch Xylose langsamer als der induzierte Stamm wächst. Das Wachstum der nicht induzierten Mutante konnte aber nicht zeigen, dass die Helikasen essentiell sind, wie es die Transformationsergebnisse angedeutet haben (siehe Abschnitt 4.12.6). Dafür sind folgende zwei Erklärungen denkbar. Einerseits ist es möglich, dass die Helikasen nicht essentiell sind, andererseits kann es aber auch sein, dass in der nicht induzierten Mutante CB3441 immer noch kälteinduzierte Helikasen produziert werden. Um die zweite Hypothese zu testen, soll die nicht induzierte Mutante CB3441 auf die Transkription von *yqfR* nach Kälteschock bei 15°C getestet werden. Ist kein Transkript von *yqfR* nachweisbar würde dies nahelegen, dass die Helikasen nicht essentiell sind.

Für die Northernblotanalyse von *yqfR* wurden Kulturproben von CB3441 und dem Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 vor und nach Kälteschock genommen. Dazu wurden beide Stämme in 200 mL SMM-Medium mit Isoleucin (5 µg/mL), Tryptophan (5 µg/mL), Phenylalanin (5 µg/mL), Fructose (0,5%) und Spurenelementen bei 37°C und 220 upm mit

und ohne Xylose (0,5%) herangezogen. Bei einer OD₆₀₀ von 0,5 wurden die Kulturen sofort in einem vorgekühlten Wasserbad bei 15°C und 220 upm geschockt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, die jeweils 15 OD Zellen entsprachen (siehe Fußnote 2 Seite 59). Die erste Probe wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C und die folgenden Proben 40 min, 80 min und 120 min nach Kälteschock bei 15°C entnommen. Die präparierte RNA wurde nach dem Dotblotten auf eine Membran mit einer Digoxigeninmarkierten RNA Sonde gegen *yqfR* hybridisiert, und das Transkriptionssignal mit Hilfe eines Fluoreszenzkits am Phosphoimager eingescannt (siehe Abbildung 4.12-7). Als Ausgangsmaterial für die Sonde wurde ein DNA Fragment aus dem Strukturgen von *yqfR* mit den Primern 5'*yqfR*_Sonde und 3'*yqfR*_Sonde+T7 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 mit PCR amplifiziert. Als Kontrolle für die mRNA wurden alle Proben ebenfalls mit einer Sonde gegen das kälteinduzierte *des* Gen hybridisiert (siehe Abschnitt 4.1.4).

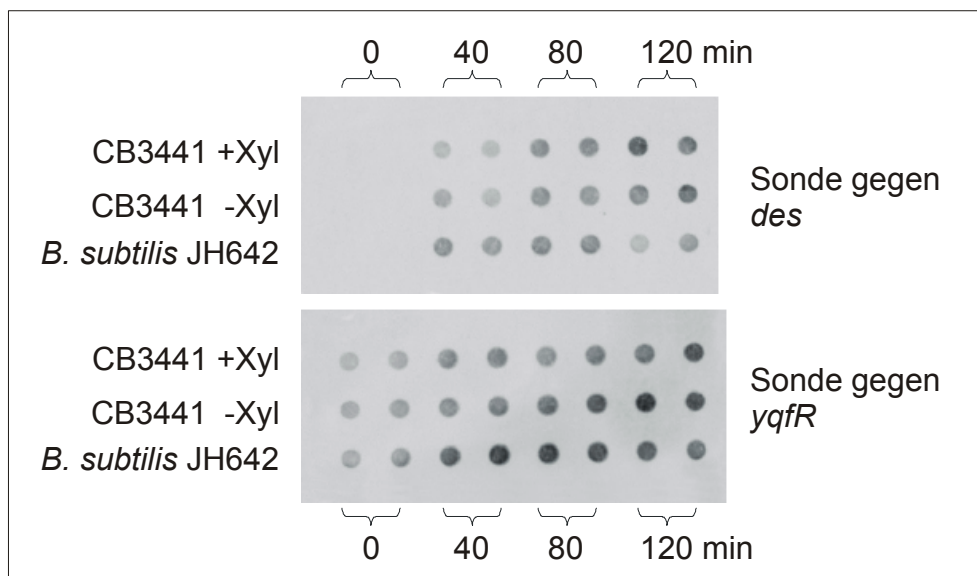


Abbildung 4.12-7 Dotblotanalyse der Transkription von *yqfR* in CB3441

Der Kontrollblot zeigt sowohl in *B. subtilis* JH642 als auch CB3441 mit und ohne Xylose das gleiche Transkriptionsmuster für *des*. Bei 37°C ist kein Transkript nachweisbar und 40-120 min nach Kälteschock ist eine Zunahme für das *des* Transkript zu beobachten. Damit werden zum einen die vorherigen Ergebnisse zur Transkription von *des* bestätigt (siehe Abschnitt 4.1.4) und zum anderen wird die Integrität der präparierten mRNA validiert.

Für die Transkription von *yqfR* im Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 ist zu erkennen, dass auch schon bei 37°C Transkript vorhanden ist, dessen Menge nach Kälteschock auf 15°C zunimmt, mit einem Maximum bei etwa 80 min nach Schock. Dies entspricht den

Erwartungen für ein kälteinduziertes Gen und bestätigt auch die Daten aus den DNA Arrays (siehe Abschnitt 4.3.2).

In der mit Xylose induzierten Mutante CB3441 ist ebenfalls bei 37°C ein Transkript von *yqfR* vorhanden, dessen Menge kontinuierlich steigt. Allerdings ist im Vergleich zum Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 nur eine relativ langsame Akkumulation des Transkripts zu beobachten. Dies ist insofern zu erwarten, da die Transkription in der induzierten CB3441 Mutante von dem kälteunabhängigen Xylosepromotor gesteuert wird, während *yqfR* in *B. subtilis* JH642 unter der Kontrolle des kälteinduzierbaren nativen Promotors steht. Die leichte Zunahme an *yqfR* Transkript in CB3441 ist möglicherweise durch eine verlängerte Halbwertszeit der mRNA bei 15°C zu erklären.

In der nicht induzierten Mutante CB3441 ist überraschender Weise ein zur induzierten Mutante vergleichbares Transkriptionsmuster für *yqfR* zu erkennen. Es erfolgt nicht wie im Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 eine schnelle Kälteinduktion, sondern eine langsame Akkumulation durch den Xylosepromotor. Den Erwartungen zu Folge sollte in der nicht induzierten Mutante kaum oder deutlich weniger *yqfR* als in der induzierten Mutante transkribiert werden. Die dennoch deutlich vorhandene Transkription von *yqfR* in CB3441 ohne Xylose lässt nur den Schluss zu, dass der Xylosepromotor durchlässig ist. Deshalb kann auch mit diesem Experiment nicht direkt nachgewiesen werden, ob die Deletion beider Helikasen lethal für *B. subtilis* ist, wie es die vorhergehenden Experimente angedeutet haben. Die Durchlässigkeit des Xylosepromotors würde auch erklären, warum die nicht induzierte Mutante CB3441 nach Kälteschock bei 15° überleben kann (siehe Abbildung 4.12-6).

4.12.10 Expression von *ydbR* und *yqfR*

Für die biochemische Charakterisierung der RNA-Helikasen sollten *ydbR* und *yqfR* in *E. coli* rekombinant exprimiert werden. Für diesen Zweck wurden zunächst verschiedene Expressionsplasmide konstruiert. Es sollten zunächst der Expressionsvektor pQE60 für eine C-terminale Fusion von YdbR und YqfR mit einem His₆-tag verwendet werden.

Für die Klonierung der pQE60 Varianten wurden *ydbR* bzw. *yqfR* durch eine PCR mit den Primern 5'*ydbR*pQE60 und 3'*ydbR*pQE60 bzw. 5'*yqfR*pQE60 und 3'*yqfR*pQE60 aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* amplifiziert und beide mit den Restriktionsendonukleasen *Nco*I und *Bgl*II geschnitten. Die PCR Fragmente wurden in die entsprechend geschnittenen pQE60 Vektoren ligiert, und die resultierenden Expressionsplasmide pQE60*ydbR* bzw. pQ60*yqfR* für die Transformation der Expressionsstämme *E. coli* BL21 und M15 verwendet. Die Stämme zur Expression von *ydbR* (BL21/pQ60*ydbR*, M15/pQ60*ydbR*) und *yqfR* (BL21/pQ60*yqfR*, M15/pQ60*yqfR*) wurden zur Auswahl geeigneter Klone zunächst

einer Testexpression unterzogen. Es konnte die Expression von YdbR-His₆ und YqfR-His₆ in allen Fällen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Weil die Löslichkeit der Helikasen YdbR und YqfR nach Expression im pQE60 System nicht zufriedenstellend war, sollte als nächstes der pBAD202 Vektor für eine Expression von *ydbR* und *yqfR* getestet werden. Neben dem C-terminalen His₆-tag führt die Verwendung des pBAD202 Vektors zu einer N-terminalen Fusion mit dem sehr gut löslichen Protein Thioredoxin. Für die Klonierung der pBAD202 Varianten wurden *ydbR* bzw. *yqfR* durch eine PCR mit den Primern BAD5'*ydbR* und BAD3'*ydbR* bzw. BAD5'*yqfR* und BAD3'*yqfR* aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* amplifiziert. Die PCR Fragmente wurden direkt in die pBAD202 Vektoren ligiert, und die resultierenden Expressionsplasmide pBAD*ydbR* bzw. pBAD*yqfR* für die Transformation von *E. coli* BL21 verwendet. Die Expressionsstämme BL21/pBAD*ydbR* und BL21/pBAD*yqfR* wurden zur Auswahl geeigneter Klone zunächst einer Testexpression unterzogen. Es konnte die Expression von YdbR-His₆ und YqfR-His₆ in beiden Fällen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Bei der Reinigung von YdbR nach Expression in BL21 war trotz der Fusion mit dem gut löslichen Protein Thioredoxin der größte Teil des Proteins unlöslich im Pellet. Nur geringe Mengen konnten nach der Proteinreinigung mit Ni²⁺-NTA Reinigung detektiert werden (siehe Abbildung 4.12-8). Durch Variation des Aufschlusspuffers sowie Expressionstemperatur und -zeit konnten keine signifikanten Verbesserungen der Löslichkeit erzielt werden.

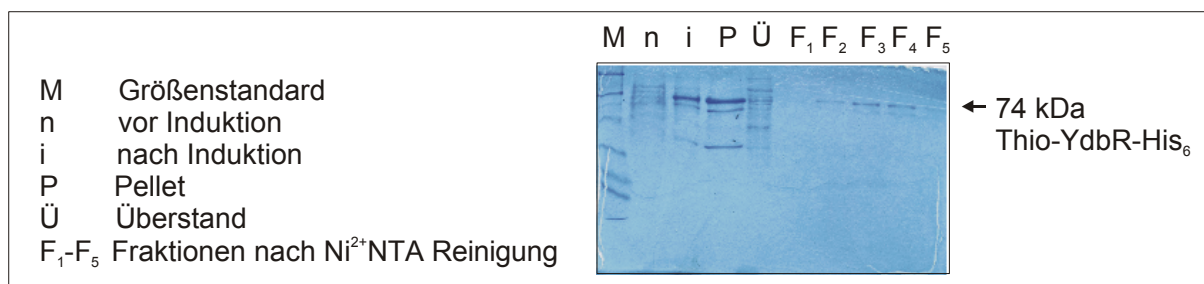


Abbildung 4.12-8 Expression und Reinigung von Thio-YdbR-His₆

Bei der Reinigung von YqfR nach Expression in BL21/pBAD*yqfR* war trotz der Fusion mit dem gut löslichen Protein Thioredoxin das gesamte Protein unlöslich im Pellet. Nur marginale Mengen konnten nach der Proteinreinigung mit Ni²⁺-NTA Reinigung detektiert werden. Durch Variation des Aufschlusspuffers sowie Expressionstemperatur und -zeit konnte keine Verbesserungen der Löslichkeit erzielt werden.

4.12.11 Lokalisation von YqfR und YdbR durch Fluoreszenzmikroskopie

Die Funktion von Proteinen ist mit ihrem Wirkort in der Zelle verknüpft. Entsprechend kann die Lokalisation von Proteinen einen Hinweis auf ihre Funktion geben. Zwar ist die intrazelluläre Organisation von Prokaryoten im Vergleich zu Eukaryoten bei weitem nicht so komplex, aber einige grundlegende Betrachtungen sind möglich.

In vorherigen Untersuchungen in *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu anderen cytosolischen Proteinen sowohl Ribosomen als auch CSP (siehe Abschnitt 1.2.1) an den Zellpolen um das Nukleoid herum angeordnet sind (Mascarenhas *et al.*, 2001). Dabei war diese Lokalisation nur in aktiv transkribierenden Zellen zu beobachten. Nach Hemmung der Transkription durch Rifampicin und bei Zellen in der Stationärphase verteilte sich das Fluoreszenzsignal homogen über die ganze Zelle. Diese Experimente stärken das Modell nachdem die CSP zwischen Transkription und Translation vermitteln (siehe Abschnitt 1.2.1).

Falls die RNA-Helikasen YdbR und YqfR aus *B. subtilis* ebenfalls an Prozessen zwischen Transkription und Translation beteiligt sind, sollte für sie ein zu den CSP und Ribosomen vergleichbares Lokalisationsmuster zu erwarten sein. Um den Wirkort der mRNA-Helikasen YdbR und YqfR aus *B. subtilis* in der Zelle bestimmen, wurden Fusionen zwischen *ydbR* bzw. *yqfR* und *gfp* konstruiert. Das von *gfp* kodierte grün fluoreszierende Protein konnte dann durch Fluoreszenzmikroskopie in der Zelle lokalisiert werden.

4.12.11.1 Konstruktion von *ydbR-gfp* und *yqfR-gfp* Fusionen

Für die *gfp*-Fusion wurde der pSG1151 Vektor verwendet, der freundlicherweise von Peter Graumann zur Verfügung gestellt wurde. Der Vektor erlaubt die Integration in das Chromosom mittels *single-crossover*. Die 3' Bereiche von *ydbR* und *yqfR* wurden durch eine PCR mit den Primern 5'*ydbR*pSG51(*Hind*III) und 3'*ydbR*pSG51(*Eco*RI) bzw. 5'*yqfR*pSG51(*Hind*III) und 3'*yqfR*pSG51(*Pst*I) aus der chromosomalen DNA von *B. subtilis* JH642 amplifiziert und mit den Restriktionsendonukleasen *Hind*III und *Eco*RI bzw. *Hind*III und *Pst*I geschnitten. Über die 3'Primer wird ein zusätzliches Glycinkodon zwischen die Gene gesetzt, um größtmögliche Beweglichkeit zwischen den Fusionsproteinen zu erlauben. Die gereinigten DNA Fragmente wurden in die entsprechend geschnittenen Vektoren ligiert, um die Plasmide pSG1151*ydbR* bzw. pSG1151*yqfR* zu geben. Die Plasmide wurden für die Transformation von *B. subtilis* JH642 eingesetzt um die Stämme CB50 (*ydbR-gfp*) bzw. CB51 (*yqfR-gfp*) zu ergeben.

4.12.11.2 Fluoreszenzmikroskopie von CB50 (*ydbR-gfp*) und CB51 (*yqfR-gfp*)

Um die Lokalisation der Helikasen während aktiver Transkription zu beobachten war es notwendig die Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase zu mikroskopieren. Dazu wurden die Stämme CB50 (*ydbR-gfp*) und CB51 (*yqfR-gfp*) in 3 mL SMM-Medium mit Isoleucin (5 µg/mL), Tryptophan (5 µg/mL), Phenylalanin (5 µg/mL), Fructose (0,5%) und Spurenelementen bei 37°C und 220 upm herangezogen. Dabei wurden gleich mehrere Verdünnungen parallel inkubiert, um zum Zeitpunkt der Mikroskopie zumindest eine exponentiell wachsende Kultur zu haben (siehe Abbildung 4.12-9 und Abbildung 4.12-10). Um die Transkription zu inhibieren, wurde Rifampicin (200 µg/mL) zugegeben (siehe Abbildung 4.12-11). Zum fixieren der Zellen für die Mikroskopie wurden die Kulturen auf einen auf dem Objektträger befindlichen Agarosefilm (SMM-Medium mit 1% Agarose) pipettiert.

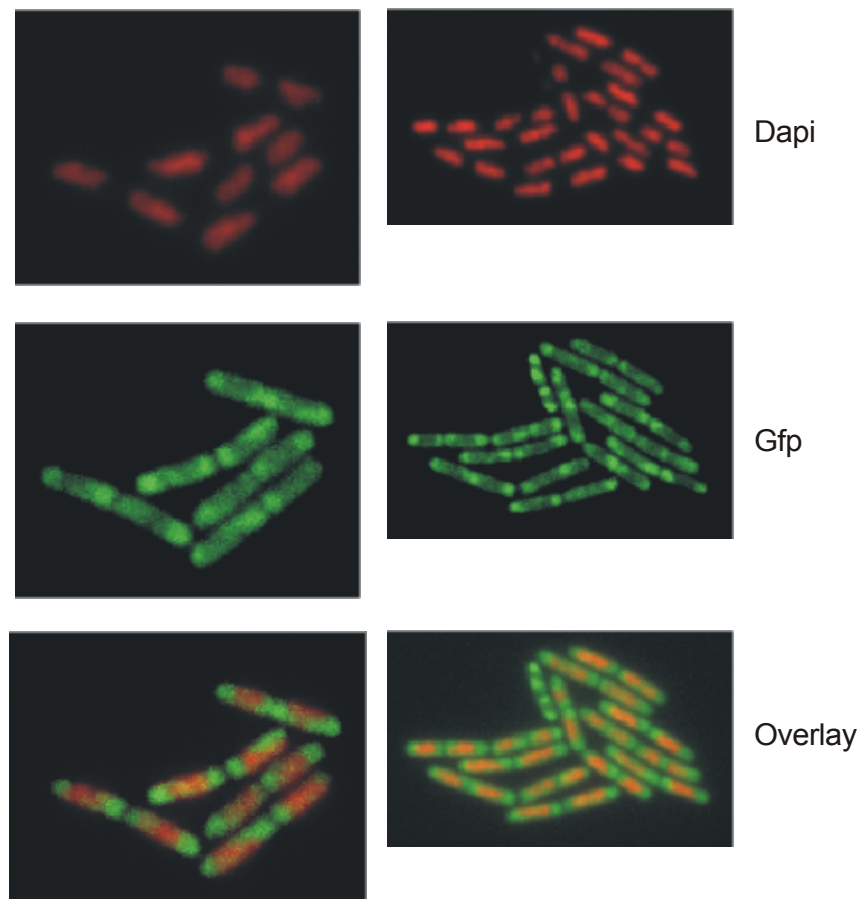


Abbildung 4.12-9 Fluoreszenzmikroskopie von CB50 (*ydbR-gfp*)

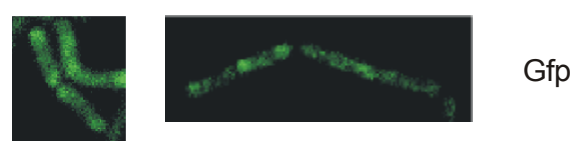


Abbildung 4.12-10 Fluoreszenzmikroskopie von CB51 (*yqfR-gfp*)

Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der exponentiell wachsenden Zellen von CB50 und CB51 zeigen deutlich, dass die Helikasen (in Grün) nicht homogen über die Zelle verteilt sind. Sie lokalisieren hauptsächlich an den Zellpolen (siehe Abbildung 4.12-9 und Abbildung 4.12-10). Dabei ist die Lokalisation in Stamm CB50 mit der YdbR-Gfp Fusion deutlicher zu sehen als für Stamm CB51 mit der YqfR-Gfp Fusion. Die Überlagerung mit der angefärbten DNA (in Rot) zeigt darüber hinaus, dass die Helikasen um das Nukleoid herum angeordnet sind. Diese Bilder zeigen exakt die gleiche Lokalisation wie für Ribosomen und die CSP gezeigt wurde (Mascarenhas *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2001c).

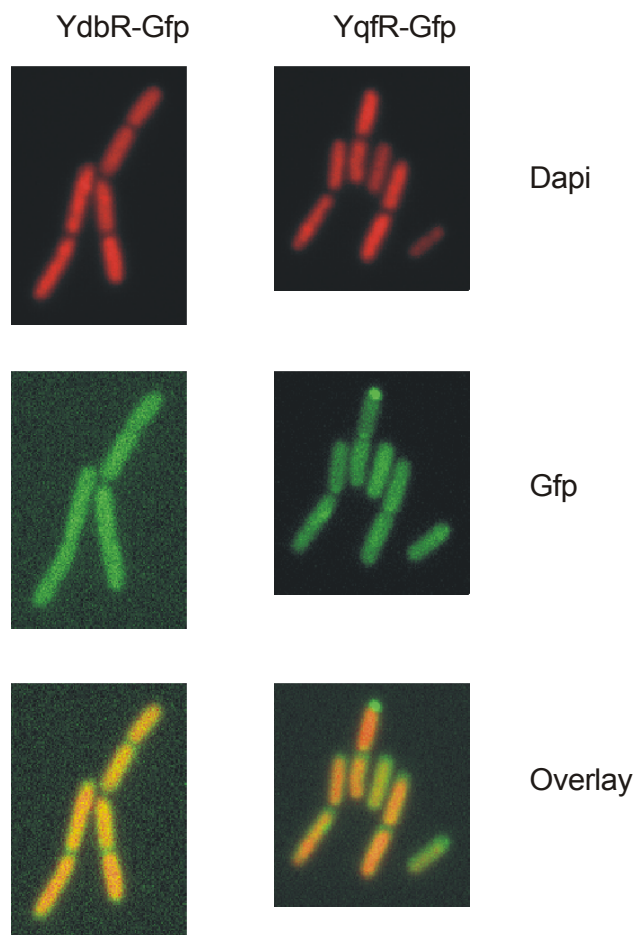
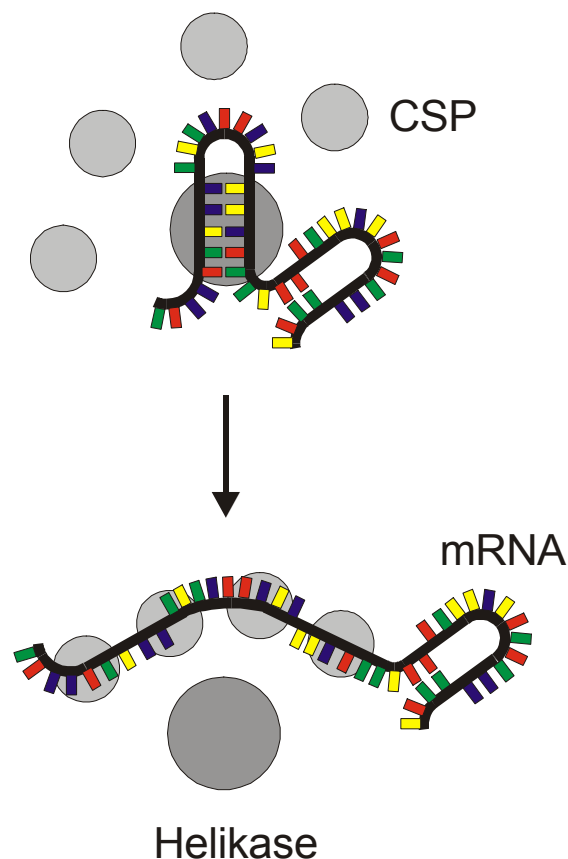


Abbildung 4.12-11 Fluoreszenzmikroskopie von YdbR-Gfp und YqfR-Gfp mit Rifampicin

Im nächsten Experiment ist zu sehen, wie die Lokalisation der Helikasen durch Zugabe des Transkriptionshemmers Rifampicin aufgehoben wurde und die beiden Helikasen homogen über die Zelle verteilt sind (siehe Abbildung 4.12-11). Auch dieses Verhalten konnte vorher schon für die Ribosomen und CSP gezeigt werden (Mascarenhas *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2001c).

Die Beobachtungen aus den fluoreszenzmikroskopischen Experimenten (siehe Abbildung 4.12-9, Abbildung 4.12-10 und Abbildung 4.12-11) lassen folgende Schlussfolgerungen zu:

(1) Die Gfp Fusionen mit YdbR und YqfR aus *B. subtilis* sind funktionell. (2) Die transkriptionsabhängige Kolokalisierung mit den Ribosomen spricht für eine Beteiligung von YdbR und YqfR an Prozessen zwischen Transkription und Translation. (3) Die transkriptionsabhängige Kolokalisierung mit den CSP stellt ein Indiz für eine überlappende Funktion von YdbR und YqfR mit den CSP dar. Folglich könnten die kälteinduzierten RNA-Helikasen YdbR und YqfR durch die aktive Entwindung kältestabiler Sekundärstrukturen in der mRNA, zusammen mit den als mRNA Chaperone diskutierten CSP, die Translation von mRNA insbesondere bei niedrigen Temperaturen gewährleisten. Damit würden kälteinduzierte RNA-Helikasen einen wichtigen Beitrag zur Kälteschockanpassung von Mikroorganismen leisten.



5 Diskussion

5.1 Die Kälteadaptation der Zellmembran in *B. subtilis*

Die Energieverteilung von Molekülen hängt von der Temperatur ab, wobei mit zunehmender Temperatur mehr Moleküle höhere Energie haben. Dieser grundlegende Zusammenhang wird durch die Boltzmannverteilung ausgedrückt. Daraus lassen sich Molekülgeschwindigkeiten (Maxwellverteilung), Molekülbewegung in Flüssigkeiten, d.h. Diffusionsraten und chemische Reaktionsgeschwindigkeiten (Arrheniusgleichung) ableiten (Atkins, 1994). Dieser physikalische Zusammenhang hat bei sinkender Temperatur das Erstarren der bakteriellen Zellmembran und die Verlangsamung oder sogar den Stop der damit gekoppelten essentiellen Funktionen zur Folge. Die Zelle begegnet diesen fatalen Folgen der Temperaturniedrigung durch eine Anpassungsreaktion, indem sie die Beweglichkeit der Fettsäurereste in der Membran erhöht und damit deren Fluidität unter den veränderten Bedingungen konstant hält (siehe Abschnitt 1.2.3). Nachdem entdeckt wurde, dass die Membranfluidität sowohl durch die Neusynthese verzweigtkettiger Fettsäurereste (Klein *et al.*, 1999) als auch durch die Einführung ungesättigter Fettsäurereste durch eine Desaturase (Aguilar *et al.*, 1998; Weber *et al.*, 2001b) angepasst wurde, stellte sich die Frage nach der Regulation dieser Mechanismen. Die folgenden Studien gaben erste Hinweise auf einen möglichen Mechanismus dieser Regulation. Zuerst wurde die Regulation des Fettsäure-desaturasegens *desB* aus *Synechocystis* durch das Zweikomponentensystem Hik19/Hik33 (Suzuki *et al.*, 2001) entdeckt. Anschließend wurden in *B. subtilis* die für ein Zweikomponentensystem kodierenden Gene *desKR* (ehemals *yocFG*) hinter dem Desaturasegen *des* (ehemals *yocE*) identifiziert. Diese Ergebnisse dienten als Grundlage für die in dieser Arbeit erfolgten Untersuchungen zur Regulation von *des* durch DesKR.

5.1.1 Die Regulation der Fettsäuredesaturase Des aus *B. subtilis*

Durch Northernblotuntersuchungen an einer *B. subtilis* JH642 *desK* Deletionsmutante konnte gezeigt werden, dass das Desaturasegen *des* durch das Zweikomponentensystem DesKR kaltespezifisch reguliert wird (siehe Abschnitt 4.1.4). Während bei 37°C kaum *des* Transkript nachzuweisen ist, wird dessen Transkription nach einem Kälteschock von 37°C auf 15°C stark induziert. Dieses Ergebnis entspricht den parallelen Untersuchungen mittels *des-lacZ* Fusionen der Arbeitsgruppe von Mendoza (Aguilar *et al.*, 2001). Neben dem Hauptergebnis, nämlich der kaltespezifischen Regulation von *des*, lieferte der Northernblot noch ein weiteres Detail der Regulation. Der Northernblot zeigte neben der Hauptbande in der

Größe des erwarteten *des* Transkripts noch eine größere aber schwächere Bande. Diese könnte durch ein Durchlesen bei der Transkription, beginnend beim dem *des* Gen bis zu den direkt dahinter befindlichen Genen *desK* und *desR*, erfolgen. Eine Analyse der DNA Sequenz zeigt hinter dem *des* Gen eine putative Terminationsschleife, die hier die Transkription terminieren könnte und das Durchlesen damit verhindern würde. Falls sie aber zumindest partiell von der RNA-Polymerase überlesen wird, könnte dies die Beobachtung des zweiten und größeren Transkripts im Northernblot erklären. Damit würden neben *des* auch die Gene des Zweikomponentensystems *desK* und *desR* eine verstärkte Transkription erfahren. Diese Vermutung wird durch die Daten aus den genomweiten Transkriptionsanalysen bestärkt, nach denen *desK* und *desR* kälteinduziert sind (siehe Abschnitt 4.3.2). Diese *feedback*-Regulation könnte die Geschwindigkeit der Anpassungsreaktion durch die erhöhte Menge an DesK und DesR in der Zelle beschleunigen (siehe Abbildung 5.1-1). Der Beweis dieser These könnte durch einen Northernblot erbracht werden, bei dem neben einer *des*-spezifischen Sonde auch eine Sonde gegen *desK* und *desR* verwendet würde.

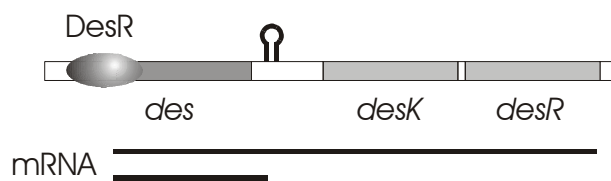


Abbildung 5.1-1 Modell zur *feedback*-Regulation von *desKR*

Erst kürzlich erfolgten weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Signalübertragung des Zweikomponentensystems DesKR. Experimente auf genetischer Basis konnten zeigen, dass die Reizerfassung in DesKR durch die membranständige N-terminale Domäne der Histidinkinase DesK erfolgt. Ausserdem konnte in der gleichen Studie *in vivo* gezeigt werden, dass die cytosolische C-terminale Domäne von DesK den Responsregulator DesR temperaturunabhängig phosphoryliert, wenn sie ohne die Membrandomäne von DesK produziert wird. In diesem Stamm wird die Transkription des Desaturasegen *des* auch bei 37°C aktiviert, was zu einer Präadaption an einen Kälteschock dieses Stammes führt (Hunger *et al.*, 2004).

5.2 Das Zweikomponentensystem DesKR ist kein allgemeiner Kältesensor

Im Rahmen der Untersuchung zur Regulation der Kälteschockantwort von *B. subtilis* JH642 ist das Zweikomponentensystem DesKR von besonderem Interesse. Dieses System bietet die notwendigen Voraussetzungen für die allgemeine Regulation kältespezifischer

Gene. Die Signalerkennung durch die Histidinkinase DesK und die Signalweiterleitung durch den Responsregulator DesR konnten für das Desaturasegen *des* aus *B. subtilis* sowohl in dieser Arbeit (siehe Abschnitt 4.1) als auch von der Gruppe Mendoza (Aguilar *et al.*, 2001) gezeigt werden. Des Weiteren führten die Ergebnisse zur Regulation kälteinduzierter Gene durch das Zweikomponentensystem Hik33/Hik19 in *Synechocystis* (Suzuki *et al.*, 2001) und die Publikation über die Regulation mehrerer Gene durch DesKR aus *B. subtilis* (Kobayashi *et al.*, 2001) zu der Hypothese, dass das Zweikomponentensystem DesKR über die gezeigte Regulation der Fettsäuredesaturase hinaus auch ein allgemeiner Kälteschockregulator für weitere Gene sein könnte. Die in der vorliegenden Arbeit initiierten Untersuchungen an einer kältegeschockten *desK* Deletionsmutante mittels genomweiter Transkriptionsanalyse versuchten diese Hypothese zu bestätigen. Allerdings konnten drei unabhängig voneinander durchgeführte DNA Mikroarrayexperimente ausschließlich die Regulation des *des* Gens durch das Zweikomponentensystem DesKR zeigen. Dementsprechend kann die Funktion des Zweikomponentensystems DesKR als allgemeiner Kältereulator ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis widerspricht den Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Fujita (Kobayashi *et al.*, 2001), deren Untersuchungen zu der oben genannten strittigen Hypothese geführt haben. Die im Vergleich zu der Arbeitsgruppe von Fujita unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich möglicherweise durch die jeweiligen experimentellen Bedingungen erklären. In der Arbeit von Kobayashi *et al.* wurde ein artifizielles System zur Identifizierung des DesKR Regulons verwendet, nämlich die verstärkte Produktion des Responsregulators DesR bei 37°C, um eine Induktion potentieller Zielgene zu erreichen. Hingegen wurde in dieser Arbeit der natürliche Stimulus des Zweikomponentensystems, die Temperaturerniedrigung, ausgenutzt. Unter der Prämisse, ausschließlich die durch DesKR kältereulierten Gene zu identifizieren, erscheint die Analyse des Regulons nach Kälteschock aussagekräftiger.

5.2.1 Warum hat die Desaturase ein eigenes Zweikomponentensystem?

Die exklusive Regulation von *des* durch das Zweikomponentensystem DesKR unterstreicht die Bedeutung der Regulation der Membranfluidität für die Zelle. Weil zahlreiche essentielle Prozesse von der biophysikalischen Eigenschaft der Membran abhängen, ist dies nicht weiter verwunderlich. Insofern erscheint es auch sinnvoll, die Regulation der Membranfluidität nicht allein einem allgemeinen Kälteschockregulon unterzuordnen. Dies stellt sicher, dass die Membran unter allen Umständen die richtige Fluidität behält und somit auch andere Faktoren, die unabhängig von einer Temperaturveränderung die biophysikalischen Eigenschaften der Membran beeinflussen, berücksichtigt werden können (siehe Abbildung 5.2-1).

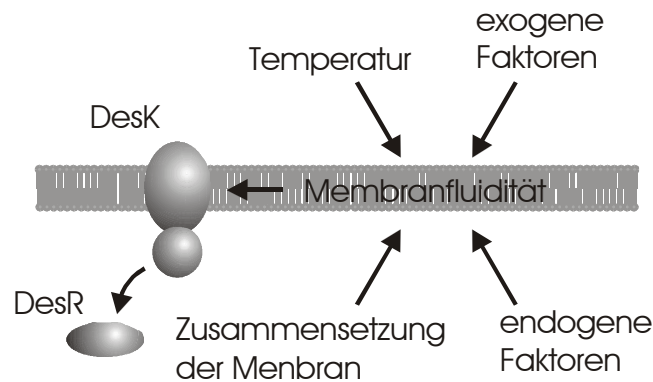


Abbildung 5.2-1 DesKR reguliert die Membranfluidität in *B. subtilis*

So ist es auch möglich die Regulation der Desaturase mit der komplexen Zusammensetzung der Membran abzustimmen, wie z.B. mit dem Anteil an verzweigt-kettigen Fettsäureresten. In der Tat ist der ausschlaggebende Faktor für die Aktivität der Histidinkinase DesK nicht die Temperaturveränderung sondern die Fluidität der Membran (Cybulski *et al.*, 2002). Damit wirkt die Temperaturniedrigung nur indirekt, nämlich durch die zunehmende Rigidität der Membran, auf die Aktivierung des Zweikomponentensystems. Wird das Zweikomponentensystem DesKR aus *B. subtilis* also als ein Fluiditätssensor und nicht als Kältesensor betrachtet, ergibt sich daraus der Grund, weshalb keine anderen kälteinduzierten Gene durch das Zweikomponentensystem reguliert werden.

5.3 Identifizierung neuer kälteinduzierter Proteine und Gene

In klassischen Untersuchungen an Mikroorganismen wurde oft zuerst ein kältesensitiver Phänotyp beobachtet und erst anschließend das entsprechende kältespezifische Protein bzw. Gen identifiziert. Die heute entwickelten Techniken zur Analyse des Proteoms mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese und der genomweiten Transkriptionsanalyse mit Hilfe von DNA-Mikroarrays machen es möglich, die an einer Stressadaption beteiligten Proteine und Gene auf direktem Weg zu identifizieren. Zudem ermöglicht die zunehmende Datenmenge aus Sequenzierungsprojekten einer Vielzahl von Organismen die umfassende Interpretation der aus Proteom- und Transkriptionsanalysen gewonnenen Daten. Der Sequenzvergleich kälteinduzierter Proteine und Gene aus *B. subtilis* mit anderen Organismen kann Hinweise auf deren Funktion geben und hilft auch bei der Beurteilung der Signifikanz der Ergebnisse. Durch die Identifizierung neuer kälteinduzierter Proteine und Gene liefern diese Techniken vielfältige Ansatzpunkte für die eigentlichen Untersuchungen an neuen Systemen, die eine Rolle für die Kälteschockanpassung spielen können.

5.3.1 Funktionelle Einordnung kälteinduzierter und kältereprimierter Gene

Der Vergleich von mRNA Mengen in *B. subtilis* JH642 bei 37°C und 15°C mittels genomweiter Transkriptionsanalyse ermöglicht einen umfassenden Überblick über kälteregulierte Gene (siehe Abschnitt 4.3.2) (Beckering *et al.*, 2002). Unter den 80 mehr als zweifach induzierten Genen konnten 40 Gene mit noch unbekannter Funktion identifiziert werden. Gerade diese Gruppe steht im Mittelpunkt fortlaufender Untersuchungen, weil sie potentielle neue Kandidaten für eine Beteiligung an der Kälteschockantwort von *B. subtilis* sind. Dem steht eine größere Anzahl von 280 mehr als zweifach reprimierten Genen gegenüber. Auch die Identität und Funktion der reprimierten Gene verschafft einen Einblick in die adaptiven Prozesse, die während eines Kälteschocks in *B. subtilis* ablaufen. Die einzelnen Gene lassen sich in funktionelle Gruppen einteilen, wie z.B. Translation, mRNA Strukturierung, DNA-Topologie, Molekültransport, Energiestoffwechsel, Aminosäurebiosynthese, Nukleotidbiosynthese und Hitzeschockgene. Die dargestellte Einteilung in diese Gruppen vereinfacht den Überblick über die vielfältigen übergeordneten Anpassungsprozesse in der Zelle.

5.3.1.1 Translation

Die Translationsinitiation wurde schon als limitierender Schritt für das Wachstum von Mikroorganismen beschrieben (siehe Abschnitt 1.2 und 1.2.2.3). Zum Einen spielt dabei die Komplexität aller beteiligten Prozesse eine Rolle, deren empfindliches Gleichgewicht durch die Temperaturniedrigung gestört wird (vgl. Boltzmannverteilung, Abschnitt 5.1). Zum Anderen konnte gezeigt werden, dass die Sekundärstruktur von mRNA einen entscheidenden Einfluss auf die Geschwindigkeit der Translationsinitiation hat, wobei die hinderlichen Sekundärstrukturen der mRNA durch niedrige Temperaturen stabilisiert werden (Hall *et al.*, 1982; Wulff *et al.*, 1984). Vor diesem Hintergrund ist die Kälteinduktion von Genen zu sehen, die für Proteine der Translation und mRNA-Strukturierung kodieren. Diese Proteine helfen der Zelle die Translation bei niedrigen Temperaturen zu bewerkstelligen. Zur Translation gehören die für ribosomale Proteine kodierende Gene *rplE* (L5), *rplF* (L6), *rplN* (L14), *rplR* (L18), *rplX* (L24), *rpmD* (L30), *rpmJ* (L36), *rpsE* (S5), *rpsH* (S8), *rpsM* (S13) und *rpsN* (S14) mit zwei- bis vierfacher Induktion. Die Kälteinduktion ribosomaler Proteine wurde auch schon in 2D-Gel Analysen beschrieben (Graumann *et al.*, 1996), was die Ergebnisse aus den DNA-Mikroarrays bestätigt. Ebenso sind *infA* und *infB* zweifach induziert, die für initiationsfaktorhomologe Proteine kodieren. Auch die zweifache Kälteinduktion des *rbfA* Gens aus *B. subtilis* kann einen Einfluss auf die Translation haben. Schließlich wurde für RbfA aus *E. coli* eine Bindung an die 30S Untereinheit des Ribosoms, die die

Translationsinitiation einleitet, bei niedrigen Temperaturen nachgewiesen (Dammel & Noller, 1995).

5.3.1.2 mRNA Strukturierung

Die Rolle von Faltungshelfern bzw. Chaperonen wird schon seit langem für die CSP diskutiert (Graumann & Marahiel, 1999). Diese mit am stärksten translatierten Proteine nach Kälteschock erfahren nach den Daten aus den Mikroarrays und zusätzlichen Northernblots auch eine transkriptionelle Induktion, wobei diese eindeutig geringer als die post-transkriptionelle ausfällt. So ist *cspB* neunfach induziert und *cspC* und *cspD* nur zweifach. Zusammen mit den CSP könnten auch kälteinduzierte RNA DEAD-Box Helikasen eine Rolle bei der mRNA-Entfaltung und/oder der Translationsinitiation eine Rolle spielen. Es wurden die kälteinduzierten Helikasen CsdA aus *E. coli* (Jones *et al.*, 1987), ChrC aus dem Cyanobakterium *Anabaena* (Chamot *et al.*, 1999) und DeaD aus dem Archaea *Methanococcoides burtonii* (Lim *et al.*, 2000) identifiziert. Durch Sequenzvergleich wurden in dieser Arbeit die homologen DEAD-Box Helikasen YdbR und YqfR aus *B. subtilis* identifiziert, deren Gene laut Mikroarrays zwei- bis dreifach induziert sind. Im nachfolgenden Abschnitt 5.4.4 wird die Rolle der Helikasen ausführlich diskutiert.

5.3.1.3 DNA-Topologie

Sowohl die Veränderung der Topologie der DNA in der Kälte war bekannt (Krispin *et al.*, 1995) als auch die Repression des kälteinduzierten *des* Gens durch den Gyrasehemmer Novobiocin (Grau *et al.*, 1994). Diese Erkenntnisse führten zu Überlegungen nach denen die Superspiralisierung der DNA, die durch die DNA Gyrase eingeführt wird, ein Instrument zur allgemeinen Kältereulation von Genen ist. Die Daten aus den Mikroarrays lieferten einen Ansatz zur Erklärung der Topologieveränderung. So sind *gyrA* und *gyrB* aus *B. subtilis* zweifach induziert. Sie kodieren für zwei Untereinheiten der DNA Gyrase, die den negativen Supercoil in die DNA einführt. Dagegen ist das *topA* Gen zweifach reprimiert. *TopA* kodiert für die Topoisomerase I, die negativen Supercoil entfernt, also der Gegenspieler der Gyrase ist. Diese antagonistische Regulation ist wahrscheinlich verantwortlich für die Zunahme der negativen Superspiralisierung bei niedrigen Temperaturen. Es bleibt in Zukunft zu klären, welche Gene durch die Topologieveränderung im einzelnen reguliert werden. Erste experimentelle Ansätze zur Klärung dieser Frage werden zur Zeit bereits mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese durchgeführt (Karen Hunger, AK Marahiel, Philipps-Universität Marburg).

5.3.1.4 Molekültransport

Am Transport von Molekülen durch die Membran sind ABC-Transporter beteiligt. In Untersuchungen über Salzstress in *B. subtilis* konnte gezeigt werden, dass osmoprotektive Substanzen wie z.B. Glycin-Betain selektiv über Transporter in die Zelle befördert werden (Bremer, 2002). Nach Kälteschock konnte nun die vier- bis siebenfache Induktion des *ytrABCDEF* Operons aus *B. subtilis* mittels genomweiter Transkriptionsanalyse gemessen werden. Die Gene dieses Operons zeigen starke Homologien zu ABC-Transportern. Weil die Gene des *ytrABCDEF* Operons kälteinduziert sind, könnten von dem kodierten ABC-Transporter kälteprotektive Substanzen in die Zelle befördert werden. Es wurde vorgeschlagen, dass dieser ABC-Transporter am Import von Acetoin in die Zelle beteiligt ist (Yoshida *et al.*, 2000). Diese Untersuchungen konnten aber nicht bestätigt werden (Hunger, 2002), und eine kälteprotektive Eigenschaft von Acetoin konnte ebenfalls nicht festgestellt werden. Damit ist die Rolle des ABC-Transporters für die Kälteschockanpassung weiterhin unbekannt.

5.3.1.5 Energiestoffwechsel

Das verlangsamte Wachstum von *B. subtilis* JH642 spiegelt sich auch in der Repression von Genen wieder, die für Proteine zentraler Stoffwechselfunktionen kodieren. So wurde durch die genomweite Transkriptionsanalyse die Repression der ATP-Synthasegene *atpABEFHI* gemessen. Ebenfalls reprimiert sind Gene der Glykolyse (*pgi*, *pgk* und *tpi*), der Pyruvat Dehydrogenase (*pdhABCD*) und des Zitronensäurezyklus (*sucC*, *sdhC* und *citG*).

5.3.1.6 Aminosäurebiosynthese

Eine große Gruppe reprimierter Gene kodiert für Proteine, die an der Aminosäurebiosynthese beteiligt sind. Diese Gene werden häufig durch *feedback*-Regulation von aminosäurebindenden Repressoren und durch Attenuationsmechanismen reguliert (Landick & Yanofsky). Die Abnahme der Geschwindigkeit der Proteinbiosynthese bei niedrigen Temperaturen führt möglicherweise zu einer Akkumulation von beladenen tRNAs und freien Aminosäuren. Diese Akkumulation könnte die gemessene Repression der Aminosäurebiosynthesegene durch die aminosäurebindenden Repressoren und frühzeitige Termination der Transkription durch Attenuation erklären.

Zur Gruppe der Aminosäurebiosynthese gehören insgesamt 31 Gene, die für Proteine der Biosynthese unpolarer (Gly, Val, Met und Ile), polarer (Ser, Thr, Pro und Gln), geladener (Arg, His und Asp) und aromatischer Aminosäuren (Phe, Tyr und Trp) kodieren. Die Hypothese der Repression der Biosyntheseoperons als Folge der Akkumulation von Aminosäuren deckt sich mit dem Temperaturregulationsmodell der Arbeitsgruppe Neidhardt

(VanBogelen *et al.*, 1990). In diesem Modell spielt der Beladungszustand von tRNAs am Ribosom eine entscheidende Rolle für die Erkennung von Kälte- oder Hitzestress (siehe Abbildung 1.3-2).

5.3.1.7 Nukleotidbiosynthese

Ebenso wie bei dem Energiestoffwechsel und der Aminosäurebiosynthese schlägt sich die reduzierte Wachstumsrate von *B. subtilis* auch in der Nukleotidbiosynthese nieder. Bei langsamer Zellteilung wird für die Replikation der DNA entsprechend weniger Synthesematerial gebraucht. Davon betroffen ist schon das *prs* Gen, welches mit der PRPP-Synthetase für ein Protein kodiert, welches den Startpunkt der Purin und Pyrimidinbiosynthese markiert (Arnvig *et al.*, 1990). Ebenfalls reprimiert sind die Gene, die für Proteine der Biosynthese von Inosin-5'-monophosphat kodieren, dem Ausgangssubstrat für die Biosynthese von ATP und GTP, sowie die meisten Gene des anschließenden Stoffwechselwegs der Purine (*purBCEFKLMNQ*, *guaB* und *ndk*). Auch Gene der Pyrimidinbiosynthese (*pyrABC*, *smbA* und *ndk*) sowie *upp* für den Pyrimidinumsatz sind reprimiert. Schließlich sind noch die Gene der Biosynthese des nukleotidhaltigen Kofaktors NAD reprimiert (*nifS* und *nadABC*).

Eine ganz neue Frage stellt sich mit der Überlegung, ob äquivalent zu dem Temperaturregulationsmodell der Arbeitsgruppe Neidhardt (VanBogelen *et al.*, 1990) die Verfügbarkeit von Nukleotiden für die DNA-Polymerase eine Regulationskaskade in der Zelle auslöst. Dann könnte es entsprechend zu dem stringenten Faktor RelA am Ribosom, der den Beladungszustand der tRNAs misst, einen Faktor an der DNA Polymerase geben, der die Nukleotidkonzentration misst.

5.3.1.8 Hitzeschockgene

Die Ergebnisse aus den DNA-Mikroarrays zeigen eine starke Repression einer Vielzahl von Hitzeschockgenen. Dies bestätigt insofern das Modell der Arbeitsgruppe Neidhardt (VanBogelen *et al.*, 1990), demzufolge Hitze- und Kälteschock oft antagonistisch reguliert werden (siehe Abbildung 1.3-2). Alle Gene aus beiden Operons der Klasse I Hitzeschockproteine (*hrcA*, *grpE*, *dnaKJ*, *yqeTU* und *groEL*, *groES*) sind nach Kälteschock von 37°C auf 15°C drei- bis siebenfach reprimiert. Diese Klasse von Hitzeschockproteinen wird durch den HrcA-CIRCE Mechanismus reguliert, der nach Akkumulation hitzedenaturierter Proteine in Kraft tritt (Mogk *et al.*, 1997). Auch Hitzeschockgene der Klasse III (*clpP*) und IV (*ahpCF*) sind dreifach auf Transkriptionsebene reprimiert. Untersuchungen durch 2D-Gel Elektrophorese konnten die Repression von GroES und ClpP auch auf Proteinebene zeigen (Graumann *et al.*, 1996). *B. subtilis* kann nach Kälteschock durch die

Repression von Hitzeschockproteinen die zu Verfügung stehenden Ressourcen sparen, und sich auf die Kälteadaptation konzentrieren.

5.3.2 Mangel durch Hitzeschock / Überfluss durch Kälteschock?

Für einige physiologische Bereiche der Zelle entsteht durch einen Hitzeschock eine Mangelsituation, die eine entsprechende Regulationskaskade zur Folge hat. Dazu gehört die Akkumulation von unbeladenen tRNAs auf Grund des schnellen Einbaus der Aminosäuren während der Proteinbiosynthese (VanBogelen *et al.*, 1990). Die unbeladenen tRNAs blockieren die A-Stelle des Ribosoms und stören damit die Kontinuität des Peptidwachstums. Sie werden unter Synthese des Botenstoffs ppGpp durch das Sensorprotein RelA wieder entfernt (Wendrich *et al.*, 2002), wobei die Akkumulation des ppGpp pleiotrope Effekte in der Zelle zur Folge hat.

Bei niedrigen Temperaturen ergibt sich für die Zellen allerdings genau der umgekehrte Fall. Die Proteinbiosynthese gehört zu den komplexen Prozessen in der Zelle, bei dem viele Komponenten in einem fein ausbalancierten Gleichgewicht zueinander stehen. Bei niedrigen Temperaturen kommt es schon bei der Translationsinitiation am Ribosom zu einer Geschwindigkeitsabnahme, die auch durch die verstärkte Synthese von kälteinduzierten Helferproteinen (CSP, mRNA-Helikasen, RbfA, ribosomale Proteine) nicht verhindert werden kann. Die verlangsamte Proteinbiosynthese wird insbesondere bei Kälteschockexperimenten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese deutlich, wobei die Neusynthese von Proteinen bei 15°C nur einen Bruchteil der Biosynthese bei 37°C ausmacht (siehe Abschnitt 4.3.3). Die verlangsamte Proteinbiosynthese hat wahrscheinlich die Akkumulation beladener tRNAs und auch freier Aminosäuren zur Folge. Im Gegensatz zum Hitzeschock dürfte damit auch die zelluläre Konzentration des Botenstoffs ppGpp sinken, was sich in pleiotropen Effekten niederschlägt (VanBogelen *et al.*, 1990). Ebenso könnte der Überfluss an beladenen tRNAs und Aminosäuren die gemessene Repression der Aminosäurebiosynthesegene erklären (siehe Abschnitt 5.3.1.6). Es bleibt bislang offen, ob nach Kälteschock auch ein Nukleotidüberschuss für die negative Regulation der Nukleotidbiosynthesegene verantwortlich ist (siehe Abschnitt 5.3.1.7). Diese beiden Beispiele erklären die negative Regulation des Stoffwechsels durch eine metabolische Überflusssituation in *B. subtilis* nach Kälteschock. Dies könnte ein allgemeines Prinzip zur Regulation darstellen, welches darüber hinaus den Vorteil hätte, dass die Zelle keine zusätzlichen kältespezifischen Regulatoren für die temperaturbedingte Kontrolle des Metabolismus benötigt. Die bisherigen Erkenntnisse zur Kälteschockantwort sind in Abbildung 5.3-1 schematisch zusammengefasst.

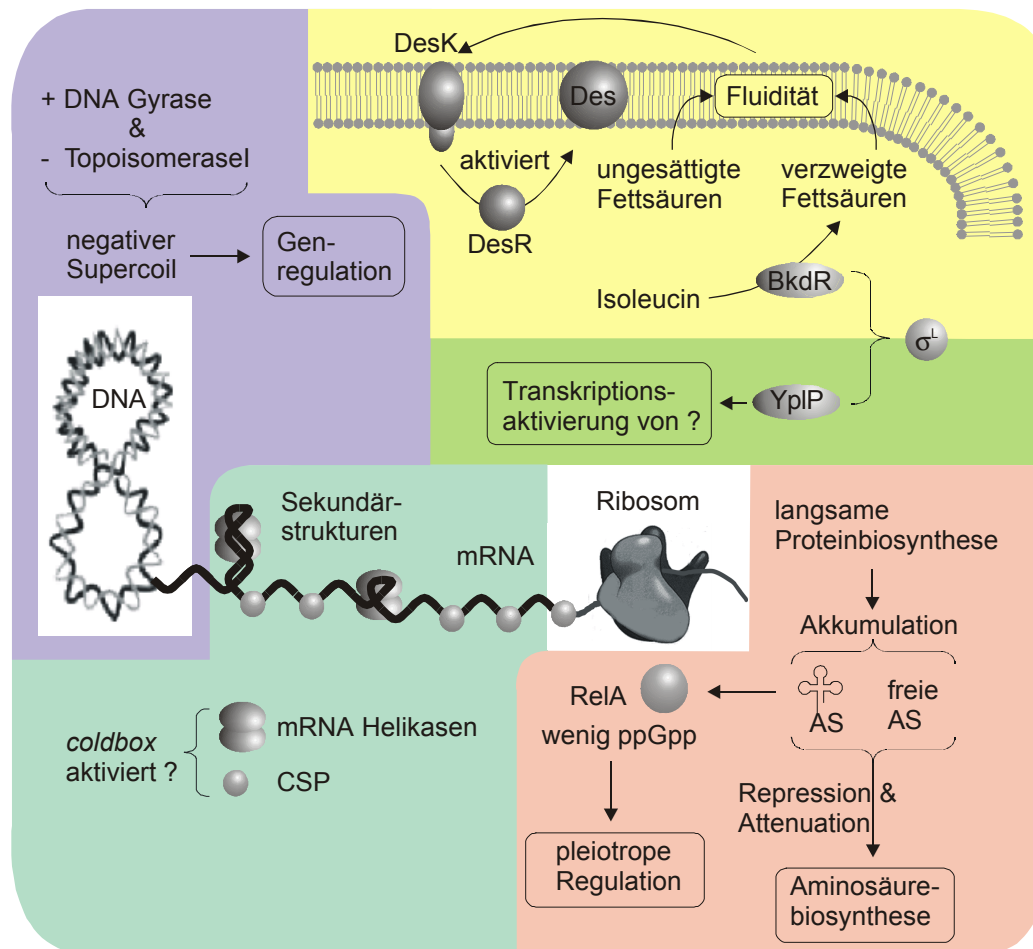


Abbildung 5.3-1 Übersicht zur Kälteschockadaptation in *B. subtilis*

5.4 Funktionelle Charakterisierung kälteinduzierter Gene

Durch genomweite Transkriptionsanalyse und zweidimensionale Gelelektrophorese wurden zahlreiche kälteinduzierte Gene und Proteine identifiziert, die eine mögliche Beteiligung an der Kälteschockantwort in *B. subtilis* haben (siehe Abschnitt 4.3). Eine Auswahl dieser Gene und Proteine wurde in dieser Arbeit weiteren Untersuchungen zugeführt, um deren Beteiligung an der Kälteanpassung zu klären. Dabei konnte in einigen Fällen wie beispielsweise bei *yplP*, *ydbR* und *yqfR* schon ein Sequenzvergleich mit Datenbanken den Hinweis auf ihre mögliche Funktion geben (siehe Abschnitte 5.4.1 und 5.4.4). Andere kälteinduzierte Gene wurden durch Gendeletion und Wachstum nach Kälteschock charakterisiert, wobei sich allerdings herausstellte, dass die meisten Einfachdeletionsmutanten keinen Phänotyp bei niedrigen Temperaturen zeigten (siehe Abschnitt 5.4.2). Die dieser Beobachtung zugrunde liegenden Faktoren werden in Abschnitt 5.4.3 diskutiert.

5.4.1 Charakterisierung von *yplP*

YplP war das einzige anhand der Mikroarraydaten ausgewählte kälteinduzierte Gen, das nach seiner Deletion einen Wachstumsdefekt bei niedrigen Temperaturen zeigte (siehe Abbildung 4.5-3). Damit war zunächst bewiesen, dass YplP eine Rolle bei der Kälteschockanpassung von *B. subtilis* spielt. Daraus ergab sich die Frage nach der Funktion von YplP. Ein Sequenzvergleich mit dem Genom von *B. subtilis* konnte zeigen, dass YplP zu einer Klasse von insgesamt fünf σ^L abhängigen Transkriptionsaktivatoren gehört, von denen die anderen vier bereits charakterisiert sind (siehe Abschnitt 1.2.3). Bislang liegen noch keine Untersuchungen zu der Bedeutung von σ^L für die Kälteanpassung vor. In diesem Zusammenhang ist allerdings interessant, dass von dem ebenfalls σ^L kontrollierten Transkriptionsaktivator BkdR Gene aktiviert werden, die am Isoleucinkatabolismus beteiligt sind (Debarbouille *et al.*, 1999). Die Produkte dieses Stoffwechselwegs werden für die Synthese verzweigtkettiger Fettsäurereste verwendet, die die Fluidität der Membran bei niedrigen Temperaturen erhält (Klein *et al.*, 1999). Dies kann als Hinweis für eine zumindest partielle Beteiligung der von σ^L abhängigen Transkriptionsaktivatoren an der Kälteschockantwort bewertet werden.

Von primärem Interesse ist deshalb die Identifizierung der von YplP aktivierten Gene sowie deren funktionelle Charakterisierung und Einordnung in die Kälteadaptation von *B. subtilis*. Ein in der vorliegenden Arbeit bereits versuchter Ansatz zur Identifizierung des YplP-Regulons durch genomweite Transkriptionsanalyse mittels DNA-Arrays an der *yplP*-Deletionsmutante CB15 führte jedoch zu keinem Ergebnis im Sinne der Untersuchung (Daten nicht gezeigt), so dass zukünftige Untersuchungen notwendig sind.

5.4.2 Charakterisierung von *ylaG*, *ydeB*, *yhfH*, *ydjO* und *veg*

Die Charakterisierung der kälteinduzierten Gene *ylaG*, *ydeB*, *yhfH*, *ydjO* und *veg* (siehe Abschnitte 4.6-4.11) erfolgte durch die Konstruktion der Deletionsmutanten CB16-CB21 und der Beobachtung deren Wachstumsverhalten nach Kälteschock von 37°C auf 15°C. Diesen Untersuchungen lag die Überlegung zu Grunde, dass diese Gene kälteinduziert und deshalb an der Kälteadaptation von *B. subtilis* beteiligt sein könnten. Die Kälteinduktion von 80 Genen schien insofern besonders relevant, da nach den Mikroarraydaten die weitaus größere Zahl von 280 Genen nach Kälteschock reprimiert sind. Demzufolge sollte die Deletion dieser Gene zur Inaktivierung ihrer Funktion und deshalb zu einem Wachstumsdefekt nach Kälteschock führen. Bei den Deletionsmutanten CB16-CB21 konnte allerdings nach Kälteschock kein Wachstumsunterschied im Vergleich zu dem Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 gemessen

werden. Zwei Gründe können diese Beobachtungen erklären. Einerseits führt die Induktion dieser Gene auf Transkriptionsebene nicht zwangsweise auch zu einem erhöhten Proteinlevel in der Zelle. Auch wenn die Proteine induziert wären, hätten sie vielleicht keinen Einfluss auf die Kälteanpassung von *B. subtilis* JH642. Eine zweite denkbare Möglichkeit bezieht sich auf die physiologische Komplexität des Organismus, der für ein kältespezifisches Problem oft mehrere Lösungsmöglichkeiten hat, so dass die Inaktivierung nur eines Systems noch keine äußerlich sichtbaren Effekte erzeugt. Diese Möglichkeit wird ausführlich in Abschnitt 5.4.3 diskutiert. Somit kann folglich noch nicht abschließend beurteilt werden, ob die Gene *ylaG*, *ydeB*, *yhfH*, *ydjO* und *veg* eine Rolle für die Kälteanpassung von *B. subtilis* spielen.

5.4.3 Warum zeigen die wenigsten Deletionsmutanten einen Wachstumsdefekt ?

Die in allen Fällen erfolgte Charakterisierung der Gene durch das Erstellen von Deletionsmutanten zielte auf die Beobachtung eines Wachstumsdefekts in Minimalmedium nach Kälteschock von 37°C auf 15°C. Diese harschen Bedingungen können am ehesten einen Phänotyp zum Vorschein bringen und damit auch die Relevanz des jeweils deletierten Gens für die Kälteschockanpassung bestätigen.

Die Untersuchung der in dieser Arbeit ausgewählten Gene sowie auch von weiteren, in Folgearbeiten untersuchten Gene (Hunger, 2002; Wiegeshoff, 2003), führte zu der Beobachtung, dass in der deutlichen Mehrheit der Fällen kein Wachstumsdefekt zu messen war (siehe Abschnitt 5.4.2). Eine gegenwärtige Erklärung dafür, dass die Deletion kälteinduzierter Gene keine negativen Folgen auf das Wachstum bei niedrigen Temperaturen hat, liegt in der Komplexität der bakteriellen Physiologie begründet. Vermutlich sind die wichtigen Anpassungssysteme der Zelle im Laufe der Evolution durch Progression nicht eingleisig geblieben, um bei einem zufälligen Defekt eines Systems nicht sofort die Existenz der ganzen Zelle zu gefährden (siehe Abbildung 5.4-1). Diese Auffassung kann durch bereits bekannte Systeme aus der Kälteadaptation belegt werden. So liegen z.B. die CSP in *B. subtilis* und anderen Bakterien in multipler Kopienzahl vor (Lee *et al.*, 1994; Graumann & Marahiel, 1996), wobei sich die homologen Proteine CspB, CspC und CspD aus *B. subtilis* gegenseitig funktionell komplementieren können. Erst die Deletion aller drei Gene ist lethal (Graumann *et al.*, 1997). Als ein Beispiel für ein analoges System kann die Anpassung der Membranfluidität in *B. subtilis* gewertet werden, bei dem die Fluidität über zwei unabhängige Wege verändert wird, nämlich durch die Synthese verzweigtkettiger oder ungesättigter Fettsäurereste (Aguilar *et al.*, 1998; Klein *et al.*, 1999). Auch hier führt erst die Inaktivierung beider Systeme zur Lyse der Zelle nach Kälteschock. Weil der Stamm *B. subtilis* JH642 seine Membran ohne externes Isoleucin nicht durch die Synthese verzweigtkettiger Fettsäurereste anpassen kann,

ist er für Untersuchungen an der Fettsäuredesaturase Des besonders geeignet. Erst in diesem Stamm wird die Desaturase essentiell.

Während homologe Systeme wie die CSP schon durch einen einfachen Sequenzvergleich bestimmt werden können, beschränken sich analoge Systeme auf ihre funktionelle Gemeinsamkeit und sind deshalb nicht aus Gen- oder Proteinsequenzen zu identifizieren.

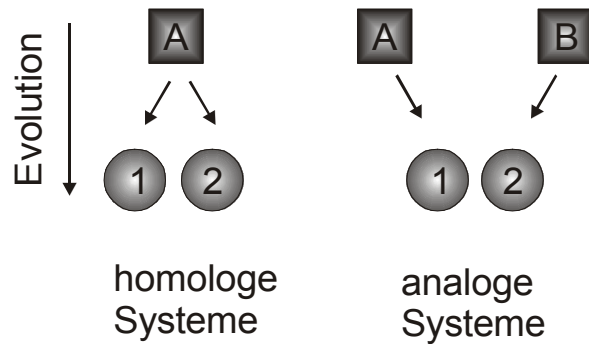


Abbildung 5.4-1 Homologe und analoge Anpassungssysteme

Daraus folgt, dass ein Wachstumsdefekt erst dann zu beobachten ist, wenn alle homologen bzw. analogen Anpassungssysteme gleichzeitig ausgeschaltet werden. Die Suche nach homologen Systemen kann durch Sequenzanalysen erfolgen. Darüber hinaus müssen Techniken eingesetzt werden, die es erlauben auch die analogen Systeme zu identifizieren. Aus diesem Grund wurden systematische Untersuchungen der erstellten Einfach-deletionsmutanten mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese initiiert, die die Identifizierung potentieller Parallel- und *backup*-Systeme erlauben (Wiegeshoff, 2003).

5.4.4 Charakterisierung der kälteinduzierten RNA-Helikasen YdbR und YqfR

Aus den Ergebnissen der Mikroarrays wurden zunächst die unbekannten und am stärksten kälteinduzierten Gene für weitere Untersuchungen ausgewählt. Danach erfolgte ein Strategiewechsel auf die Untersuchung schwacher kälteinduzierten Gene, von denen durch Sequenzvergleiche jedoch eine mögliche Funktion bekannt war, welche auf eine Rolle bei der Kälteadaptation hinwies. Zu dieser Gruppe gehören die kälteinduzierten Gene *yqfR* und *ydbR* aus *B. subtilis*. Durch einen Sequenzvergleich konnten sie als DEAD-Box RNA-Helikasen identifiziert werden. Das besondere Interesse an diesen Helikasen ergab sich aus der Tatsache, dass bereits in verschiedenen Organismen kälteinduzierte mRNA-Helikasen identifiziert wurden. Dazu gehören CsdA aus *E. coli* (Jones *et al.*, 1987), ChrC aus dem Cyanobakterium *Anabaena* (Chamot *et al.*, 1999), DeaD aus dem Archaea *Methanococcoides burtonii* (Lim *et al.*, 2000) und CBF3 aus der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Gong *et al.*,

2002). Die in so verschiedenen Organismen identifizierten kälteinduzierten Helikasen sprechen für eine generelle Beteiligung von RNA-Helikasen bei der Kälteschockadaptation.

Das gemeinsame Funktionsmerkmal aller mRNA-Helikasen ist die Strukturisomerosierung von RNA, allerdings sind deren physiologische Rollen durch starke Differenzierung der N- und C- terminalen Domäne weit gestreut (siehe Abschnitt 1.2.2.1). Der Funktionsbereich einiger mRNA-Helikasen konnte weitgehend geklärt werden, so werden z.B. die *B. subtilis* DbpA homologen Helikasen spezifisch durch ein kleines Strukturmerkmal der 23S-RNA aktiviert (Kossen *et al.*, 1999). Dagegen konnte den kälteinduzierten mRNA-Helikasen noch keine definitive Funktion zugeordnet werden. Lediglich zur Funktion von CsdA aus *E. coli* gibt es einige Untersuchungen mit dem Ergebnis, dass CsdA bei niedrigen Temperaturen an das Ribosom bindet (Jones *et al.*, 1996). Eine neuere Untersuchung zu CsdA zeigt die Komplementation einer *E. coli rpsB^{ts}* Mutante (ribosomales Protein S2) durch Expression von *csdA* auf einem Plasmid (Moll *et al.*, 2002). CsdA konnte anscheinend die Bindung von S1 an das Ribosom restaurieren, die in der S2 defizienten Mutante verloren gegangen war. Das ribosomale Protein S1 ist für die Translation von hochstrukturierter mRNA verantwortlich (Szer *et al.*, 1975; de Smit & van Duin, 1994), die besonders bei niedrigen Temperaturen problematisch ist (Hall *et al.*, 1982). Diese Daten werden in einem Modell diskutiert, bei dem CsdA eher an der Ribosomenbiogenese als an der direkten Strukturformung der mRNA beteiligt ist (Moll *et al.*, 2002).

Eine relativ hohe Ähnlichkeit der funktionsbestimmenden C-Termini wie bei den homologen RNA-Helikasen DbpA aus *B. subtilis* und *E. coli* konnte für YdbR und YqfR aus *B. subtilis* nicht gefunden werden. Damit ist die funktionelle Einordnung durch den Vergleich zu den anderen Helikasen nicht durch Sequenzvergleich möglich. Ein Modell zur Funktion dieser Helikasen kann deshalb nur auf der Basis der in Abschnitt 4.12 beschriebenen Experimente erstellt werden, aus denen sich folgende Punkte ableiten lassen.

(1) Das mit dem Kontrollstamm *B. subtilis* JH642 vergleichbare Wachstum der Einzelmутanten CB30 ($\Delta ydbR$) und CB40 ($\Delta yqfR$) kann durch die gegenseitige Komplementation der Helikasen erklärt werden. Dieses Phänomen wurde zuvor auch schon für die CSP aus *B. subtilis* beobachtet (Graumann *et al.*, 1997).

(2) Die induzierbare Doppelmутante CB3441 wächst bei 37°C langsamer als der Kontrollstamm JH642, weil die Funktion der Helikasen auch unter optimalen Bedingungen wichtig ist. Diese Eigenschaft wird ebenfalls mit den CSP aus *B. subtilis* geteilt (Graumann *et al.*, 1997).

(3) Die nicht induzierte Doppelmutante CB3441 wächst nach Kälteschock von 37°C auf 15°C schlechter als die induzierte Doppelmutante. Daraus folgt, dass die Helikasen an der Kälteschockantwort von *B. subtilis* beteiligt sind.

(4) Die Northernblotuntersuchung der induzierbaren Doppelmutante CB3441 zeigt, dass in dem untersuchten Stamm der Xylosepromoter durchlässig ist. Dieser sollte die Expression von *yqfR* in der Abwesenheit von Xylose eigentlich nicht zulassen. Dass aber der Northernblot eine Transkription von *yqfR* ohne Xylose zeigt, könnte ein indirekter Hinweis dafür sein, dass *B. subtilis* nicht besonders gut ohne die Helikasen auskommt. Ein direkter Beweis, dass die Helikasen essentiell sind, steht noch aus, aber neben den grundsätzlich misslungenen Versuchen zur Erstellung einer echten Doppelmutante ist dies ein Hinweis auf die wichtige Bedeutung beider Helikasen für das Überleben von *B. subtilis* JH642.

(5) Die in dieser Arbeit erfolgten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von YdbR und YqfR zeigten eine transkriptionsabhängige Lokalisierung der mRNA-Helikasen YdbR und YqfR an den Zellpolen um das Nukleoid. Sie kolokalisieren mit den Ribosomen und den CSP, deren Lokalisation ebenfalls von aktiver Transkription abhängt (Mascarenhas *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2001c).

(6) Die Helikasegene *ydbR* und *yqfR* weisen in ihrem 5' untranslatierten Bereich eine *cold-box* auf wie auch die CSP. Diese konservierte Sequenz wird im Zusammenhang mit der Regulation kälteinduzierter Gene diskutiert. Auch die anderen kälteinduzierten mRNA-Helikasen (*E. coli* CsdA, *Anabaena* ChrC, *Methanococcoides burtonii* DeaD) haben eine *cold-box* (Lim *et al.*, 2000). Sie ist also ein gemeinsames Merkmal der kälteinduzierten Helikasen und der CSP.

Viele dieser Ergebnisse weisen auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen den mRNA-Helikasen YdbR und YqfR und den CSP aus *B. subtilis* hin. Die Funktion der Helikasen als RNA-Strukturformer und der CSP als mRNA-Chaperone dient als Grundlage zur Erstellung des nachfolgenden Modells. Die bei niedrigen Temperaturen stabilisierten Sekundärstrukturen der mRNA stören die Initiation der Translation (Hall *et al.*, 1982). Um dies zu verhindern, werden diese Strukturen zuerst unter Energieaufwendung von den RNA-Helikasen entwunden, damit im zweiten Schritt die kooperative Bindung der CSP an die mRNA deren erneute Strukturierung verhindert. Dies ist eine Arbeitsteilung, bei der sich die RNA Helikasen um die mRNA-Sekundärstrukturen kümmern und die CSP um die entwundene ssRNA. Die Aufteilung ist insofern notwendig, weil die CSP nur an ssRNA und deshalb nicht an Sekundärstrukturen binden können und die RNA-Helikasen zwar die

Sekundärstrukturen entwinden, aber ihre Rückbildung nicht verhindern. Dieses Modell ist in Abbildung 5.4-2 schematisch dargestellt.

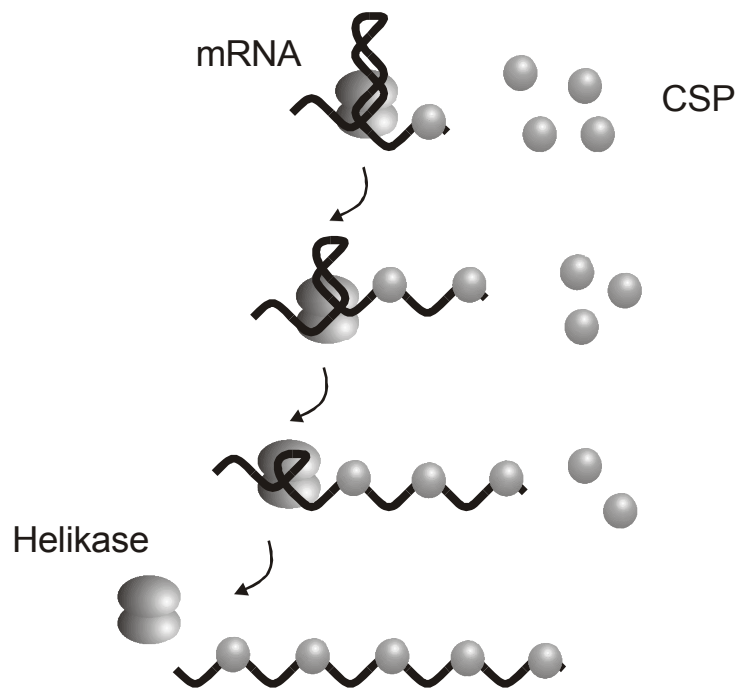


Abbildung 5.4-2 Modell zur Arbeitsteilung von CSP und Helikasen

6 Literatur

- Aguilar, P.S., Cronan, J.E., Jr. und de Mendoza, D. (1998). A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J Bacteriol* **180**(8), 2194-200.
- Aguilar, P.S., Hernandez-Arriaga, A.M., Cybulski, L.E., Erazo, A.C. und de Mendoza, D. (2001). Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. *Embo J* **20**(7), 1681-91.
- Altabe, S.G., Aguilar, P., Caballero, G.M. und de Mendoza, D. (2003). The *Bacillus subtilis* acyl lipid desaturase is a $\Delta 5$ desaturase. *J Bacteriol* **185**(10), 3228-31.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. und Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**(3), 403-10.
- Arnvig, K., Hove-Jensen, B. und Switzer, R.L. (1990). Purification and properties of phosphoribosyl-diphosphate synthetase from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **192**(1), 195-200.
- Atkins, P.W. (1994). *Physical Chemistry*. fifth edition, Oxford University Press, Oxford.
- Beckerling, C.L., Steil, L., Weber, M.H., Völker, U. und Marahiel, M.A. (2002). Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**(22), 6395-402.
- Bennett, J. und Scott, K.J. (1971). Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem* **43**(1), 173-82.
- Birnboim, H.C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**(6), 1513-23.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bremer, E. (2002). Adaptation to Changing Osmolarity. In *Bacillus subtilis* and Its Closest Relatives: from Genes to Cells (Sonenshein, A.L., ed.), pp. 385-390. ASM Press, Washington, D.C.
- Brigulla, M., Hoffmann, T., Krisp, A., Völker, A., Bremer, E. und Völker, U. (2003). Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. *J Bacteriol* **185**(15), 4305-14.
- Broeze, R.J., Solomon, C.J. und Pope, D.H. (1978). Effects of low temperature on in vivo and in vitro protein synthesis in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* **134**(3), 861-74.
- Bujard, H., Gentz, R., Lanzer, M., Stueber, D., Mueller, M., Ibrahimi, I., Haeuptle, M.T. und Dobberstein, B. (1987). A T5 promoter-based transcription-translation system for the analysis of proteins in vitro and in vivo. *Methods Enzymol* **155**, 416-33.
- Calogero, S., Gardan, R., Glaser, P., Schweizer, J., Rapoport, G. und Debarbouille, M. (1994). RocR, a novel regulatory protein controlling arginine utilization in *Bacillus subtilis*, belongs to the NtrC/NifA family of transcriptional activators. *J Bacteriol* **176**(5), 1234-41.
- Chamot, D., Magee, W.C., Yu, E. und Owtrim, G.W. (1999). A cold shock-induced cyanobacterial RNA helicase. *J Bacteriol* **181**(6), 1728-32.
- Cloutier, J., Prevost, D., Nadeau, P. und Antoun, H. (1992). Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of *rhizobia*. *Appl Environ Microbiol* **58**(9), 2846-53.
- Cybulski, L.E., Albanesi, D., Mansilla, M.C., Altabe, S., Aguilar, P.S. und de Mendoza, D. (2002). Mechanism of membrane fluidity optimization: isothermal control of the *Bacillus subtilis* acyl-lipid desaturase. *Mol Microbiol* **45**(5), 1379-88.

- Dagert, M. und Ehrlich, S.D. (1979). Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6**(1), 23-8.
- Dammel, C.S. und Noller, H.F. (1995). Suppression of a cold-sensitive mutation in 16S rRNA by overexpression of a novel ribosome-binding factor, RbfA. *Genes Dev* **9**(5), 626-37.
- de Smit, M.H. und van Duin, J. (1994). Translation initiation on structured messengers: another role for the Shine-Dalgarno interaction. *J Mol Biol* **235**, 173-184.
- Debarbouille, M., Gardan, R., Arnaud, M. und Rapoport, G. (1999). Role of BkdR, a transcriptional activator of the sigL-dependent isoleucine and valine degradation pathway in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**(7), 2059-66.
- Debarbouille, M., Martin-Verstraete, I., Klier, A. und Rapoport, G. (1991). The transcriptional regulator LevR of *Bacillus subtilis* has domains homologous to both sigma 54- and phosphotransferase system-dependent regulators. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(6), 2212-6.
- Farabaugh, P.J., Schmeissner, U., Hofer, M. und Miller, J.H. (1978). Genetic studies of the lac repressor. VII. On the molecular nature of spontaneous hotspots in the *lacI* gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **126**(4), 847-57.
- Gong, Z., Lee, H., Xiong, L., Jagendorf, A., Stevenson, B. und Zhu, J.-K. (2002). RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17), 11507-11512.
- Gonzy-Treboul, G., Karmazyn-Campelli, C. und Stragier, P. (1992). Developmental regulation of transcription of the *Bacillus subtilis* *ftsAZ* operon. *J Mol Biol* **224**(4), 967-79.
- Gorbalenya, A.E. und Koonin, E.V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr. Opin. Struct. Biol* **3**, 419-429.
- Grau, R. und de Mendoza, D. (1993). Regulation of the synthesis of unsaturated fatty acids by growth temperature in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **8**(3), 535-42.
- Grau, R., Gardiol, D., Glikin, G.C. und de Mendoza, D. (1994). DNA supercoiling and thermal regulation of unsaturated fatty acid synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **11**(5), 933-41.
- Graumann, P. und Marahiel, M.A. (1994). The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high affinity to the ATTGG- and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides. *FEBS Lett* **338**(2), 157-60.
- Graumann, P. und Marahiel, M.A. (1996). A case of convergent evolution of nucleic acid binding modules. *Bioessays* **18**(4), 309-15.
- Graumann, P. und Marahiel, M.A. (1996). Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. *Arch Microbiol* **166**(5), 293-300.
- Graumann, P., Schröder, K., Schmid, R. und Marahiel, M.A. (1996). Cold shock stress-induced proteins in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**(15), 4611-9.
- Graumann, P., Wendrich, T.M., Weber, M.H., Schröder, K. und Marahiel, M.A. (1997). A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. *Mol Microbiol* **25**(4), 741-56.
- Graumann, P.L. und Marahiel, M.A. (1998). A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. *Trends Biochem Sci* **23**(8), 286-90.
- Graumann, P.L. und Marahiel, M.A. (1999). Cold shock response in *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**(2), 203-9.
- Guerout-Fleury, A.M., Shazand, K., Frandsen, N. und Stragier, P. (1995). Antibiotic-resistance cassettes for *Bacillus subtilis*. *Gene* **167**(1-2), 335-6.
- Guzman, L.M., Belin, D., Carson, M.J. und Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. *J Bacteriol* **177**(14), 4121-30.

- Hall, M.N., Gabay, J., Debarbouille, M. und Schwarz, M. (1982). A role for messenger-RNA secondary structure in the control of translation initiation. *Nature* **295**, 616-618.
- Hanna, M.M. und Liu, K. (1998). Nascent RNA in transcription complexes interacts with CspE, a small protein in *E. coli* implicated in chromatin condensation. *J Mol Biol* **282**(2), 227-39.
- Haseltine, W.A., Block, R., Gilbert, W. und Weber, K. (1972). MSI and MSII made on ribosome in idling step of protein synthesis. *Nature* **238**(5364), 381-4.
- Hecker, M. und Volker, U. (2001). General stress response of *Bacillus subtilis* and other bacteria. *Adv Microb Physiol* **44**, 35-91.
- Hoch, J.A. und Mathews, J. (1973). Chromosomal location of pleiotropic sporulation mutations in *Bacillus subtilis*. *Genetics* **73**, 215-228.
- Huang, M., Oppermann-Sanio, F.B. und Steinbuchel, A. (1999). Biochemical and molecular characterization of the *Bacillus subtilis* acetoin catabolic pathway. *J Bacteriol* **181**(12), 3837-41.
- Huang, Y. und Liu, Z. (2002). The ATPase, RNA Unwinding, and RNA Binding Activities of Recombinant p68 RNA Helicase. *J Biol Chem* **277**(April 12), 12810-12815.
- Hunger, K. (2002). Rolle des Zweikomponentensystems DesK/DesR und des ABC-Transporters YtrABCDEF bei der Kälteanpassung von *Bacillus subtilis*. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Hunger, K. (2004). Genetic evidence for the temperature-sensing ability of the membrane domain of the *Bacillus subtilis* histidine kinase DesK. *FEMS Microbiol Lett* **230**, 41-46.
- Jiang, W., Fang, L. und Inouye, M. (1996). The role of the 5'-end untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, in cold-shock adaptation. *J Bacteriol* **178**(16), 4919-25.
- Jiang, W., Hou, Y. und Inouye, M. (1997). CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. *J Biol Chem* **272**(1), 196-202.
- Jiang, W., Jones, P. und Inouye, M. (1993). Chloramphenicol induces the transcription of the major cold shock gene of *Escherichia coli*, cspA. *J Bacteriol* **175**(18), 5824-8.
- Jones, P.G., Krah, R., Tafuri, S.R. und Wolffe, A.P. (1992). DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**(18), 5798-802.
- Jones, P.G., Mitta, M., Kim, Y., Jiang, W. und Inouye, M. (1996). Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(1), 76-80.
- Jones, P.G., VanBogelen, R.A. und Neidhardt, F.C. (1987). Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**(5), 2092-5.
- Kaan, T., Homuth, G., Mader, U., Bandow, J. und Schweder, T. (2002). Genome-wide transcriptional profiling of the *Bacillus subtilis* cold-shock response. *Microbiology* **148**(Pt 11), 3441-55.
- Kaan, T., Jurgen, B. und Schweder, T. (1999). Regulation of the expression of the cold shock proteins CspB and CspC in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **262**(2), 351-4.
- Kaneda, T. (1977). Fatty acids of the genus *Bacillus*: an example of branched-chain preference. *Bacteriol Rev* **41**(2), 391-418.
- Kaneda, T. (1991). Iso- and anteiso-fatty acids in bacteria: biosynthesis, function, and taxonomic significance. *Microbiol Rev* **55**(2), 288-302.
- Kim, L., Mogk, A. und Schumann, W. (1996). A xylose-inducible *Bacillus subtilis* integration vector and its application. *Gene* **181**(1-2), 71-6.
- Klein, C., Kaletta, C., Schnell, N. und Entian, K.D. (1992). Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. *Appl Environ Microbiol* **58**(1), 132-42.

- Klein, W., Weber, M.H. und Marahiel, M.A. (1999). Cold shock response of *Bacillus subtilis*: isoleucine-dependent switch in the fatty acid branching pattern for membrane adaptation to low temperatures. *J Bacteriol* **181**(17), 5341-9.
- Kobayashi, K., Ogura, M., Yamaguchi, H., Yoshida, K., Ogasawara, N., Tanaka, T. und Fujita, Y. (2001). Comprehensive DNA microarray analysis of *Bacillus subtilis* two-component regulatory systems. *J Bacteriol* **183**(24), 7365-70.
- Kossen, K. und Uhlenbeck, O.C. (1999). Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. *Nucleic Acids Res* **27**(19), 3811-3820.
- Kremer, W., Schuler, B., Harrieder, S., Geyer, M., Gronwald, W., Welker, C., Jaenicke, R. und Kalbitzer, H.R. (2001). Solution NMR structure of the cold-shock protein from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Eur J Biochem* **268**(9), 2527-39.
- Krispin, O. und Allmansberger, R. (1995). Changes in DNA supertwist as a response of *Bacillus subtilis* towards different kinds of stress. *FEMS Microbiol Lett* **134**(2-3), 129-35.
- Kuwayama, H., Obara, S., Morio, T., Katoh, M., Urushihara, H. und Tanaka, Y. (2002). PCR-mediated generation of a gene disruption construct without the use of DNA ligase and plasmid vectors. *Nucleic Acids Res* **30**(2), E2-2.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- Landick, R. und Yanofsky, C. Transcription Attenuation, pp. 1276-1301.
- Lee, S.J., Xie, A., Jiang, W., Etchegaray, J.P., Jones, P.G. und Inouye, M. (1994). Family of the major cold-shock protein, CspA (CS7.4), of *Escherichia coli*, whose members show a high sequence similarity with the eukaryotic Y-box binding proteins. *Mol Microbiol* **11**(5), 833-9.
- Lewis, P.J. und Marston, A.L. (1999). GFP vectors for controlled expression and dual labelling of protein fusions in *Bacillus subtilis*. *Gene* **227**(1), 101-10.
- Lewis, P.J., Thaker, S.D. und Errington, J. (2000). Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Embo J* **19**, 710-718.
- Lim, J., Thomas, T. und Cavicchioli, R. (2000). Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. *J Mol Biol* **297**(3), 553-67.
- Lopez, M.M. und Makhatadze, G.I. (2000). Major cold shock proteins, CspA from *Escherichia coli* and CspB from *Bacillus subtilis*, interact differently with single-stranded DNA templates. *Biochim Biophys Acta* **1479**(1-2), 196-202.
- Lopez, M.M., Yutani, K. und Makhatadze, G.I. (1999). Interactions of the major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB with single-stranded DNA templates of different base composition. *J Biol Chem* **274**(47), 33601-8.
- Lottering, E.A. und Streips, U.N. (1995). Induction of cold shock proteins in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **30**(4), 193-9.
- Luking, A., Stahl, U. und Schmidt, U. (1998). The protein family of RNA helicases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **33**, 259-296.
- Majumdar, D., Avissar, Y.J. und Wyche, J.H. (1991). Simultaneous and rapid isolation of bacterial and eukaryotic DNA and RNA: a new approach for isolating DNA. *Biotechniques* **11**(1), 94-101.
- Mascarenhas, J., Weber, M.H. und Graumann, P.L. (2001). Specific polar localization of ribosomes in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. *EMBO Rep* **2**(8), 685-9.

- Mikulik, K., Khanh-Hoang, Q., Halada, P., Bezouskova, S., Benada, O. und Behal, V. (1999). Expression of the Csp protein family upon cold shock and production of tetracycline in *Streptomyces aureofaciens*. *Biochem Biophys Res Commun* **265**(2), 305-10.
- Mogk, A., Homuth, G., Scholz, C., Kim, L., Schmid, F.X. und Schumann, W. (1997). The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *Embo J* **16**(15), 4579-90.
- Moll, I., Grill, S., Gründling, A. und Bläsi, U. (2002). Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the DeaD/CsdA DEAD-box helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**(5), 1387-1396.
- Mullis, K.B. und Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**, 335-50.
- Neuhaus, K., Rapposch, S., Francis, K.P. und Scherer, S. (2000). Restart of exponential growth of cold-shocked *Yersinia enterocolitica* occurs after down-regulation of cspA1/A2 mRNA. *J Bacteriol* **182**(11), 3285-8.
- Newkirk, K., Feng, W., Jiang, W., Tejero, R., Emerson, S.D., Inouye, M. und Montelione, G.T. (1994). Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli*: identification of a binding epitope for DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11), 5114-8.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250**(10), 4007-21.
- Perl, D., Mueller, U., Heinemann, U. und Schmid, F.X. (2000). Two exposed amino acid residues confer thermostability on a cold shock protein. *Nat Struct Biol* **7**(5), 380-3.
- Petersohn, A., Brigulla, M., Haas, S., Hoheisel, J.D., Völker, U. und Hecker, M. (2001). Global analysis of the general stress response of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**(19), 5617-31.
- Phadtare, S., Alsina, J. und Inouye, M. (1999a). Cold-shock response and cold-shock proteins. *Curr Opin Microbiol* **2**(2), 175-80.
- Phadtare, S. und Inouye, M. (1999b). Sequence-selective interactions with RNA by CspB, CspC and CspE, members of the CspA family of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**(5), 1004-14.
- Phan-Thanh, L. und Gormon, T. (1995). Analysis of heat and cold shock proteins in *Listeria* by two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **16**(3), 444-50.
- Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I. und Belfrage, G. (1975). Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258**(5536), 598-9.
- Rabilloud, T. (1990). Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis. *Electrophoresis* **11**(10), 785-94.
- Rogers, G.W., Richter, N.J. und Merrick, W.C. (1999). Biochemical and Kinetik Charakterization of the RNA Helikase Activity of Eukaryotic Initiation Factor 4A. *J Biol Chem* **18**(April 30), 12236-12244.
- Rozen, F., Pelletier, J., Trachsel, H. und Sonenberg, N. (1989). A lysine substitution in the ATP-binding site of eucaryotic initiation factor 4A abrogates nucleotide-binding activity. *Mol Cell Biol* **9**(9), 4061-3.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12), 5463-7.
- Schindelin, H., Jiang, W., Inouye, M. und Heinemann, U. (1994). Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11), 5119-23.
- Schindelin, H., Marahiel, M.A. und Heinemann, U. (1993). Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. *Nature* **364**(6433), 164-8.

- Schmid, S.R. und Linder, P. (1992). DEAD protein family of putative RNA helicases. *Mol. Microbiol.* **6**, 238-292.
- Schnuchel, A., Wiltschek, R., Czisch, M., Herrler, M., Willmsky, G., Graumann, P., Marahiel, M.A. und Holak, T.A. (1993). Structure in solution of the major cold-shock protein from *Bacillus subtilis*. *Nature* **364**(6433), 169-71.
- Schröder, K., Graumann, P., Schnuchel, A., Holak, T.A. und Marahiel, M.A. (1995). Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. *Mol Microbiol* **16**(4), 699-708.
- Serrano, M., Hovel, S., Moran, C.P., Jr., Henriques, A.O. und Völker, U. (2001). Forespore-specific transcription of the *lonB* gene during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**(10), 2995-3003.
- Shingler, V. (1996). Signal sensing by sigma 54-dependent regulators: derepression as a control mechanism. *Mol Microbiol* **19**(3), 409-16.
- Southern, J.A., Young, D.F., Heaney, F., Baumgartner, W.K. und Randall, R.E. (1991). Identification of an epitope on the P and V proteins of simian virus 5 that distinguishes between two isolates with different biological characteristics. *J Gen Virol* **72** (Pt 7), 1551-7.
- Sutcliffe, J.G. (1979). Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **43 Pt 1**, 77-90.
- Suzuki, I., Kanesaki, Y., Mikami, K., Kanehisa, M. und Murata, N. (2001). Cold-regulated genes under control of the cold sensor Hik33 in *Synechocystis*. *Mol Microbiol* **40**(1), 235-44.
- Suzuki, I., Los, D.A., Kanesaki, Y., Mikami, K. und Murata, N. (2000). The pathway for perception and transduction of low-temperature signals in *Synechocystis*. *Embo J* **19**(6), 1327-34.
- Szer, W., Hermoso, J.M. und Leffler, S. (1975). Ribosomal protein S1 and polypeptide chain initiation in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 2325-2329.
- Tsu, C.A., Kossen, K. und Uhlenbeck, O.C. (2001). The *Escherichia coli* DEAD protein DbpA recognizes a small RNA hairpin in 23S rRNA. *RNA* **7**, 702-709.
- Tsu, C.A. und Uhlenbeck, O.C. (1998). Kinetik Analysis of the RNA-Dependent Adenosinetriphosphatase Activity of DbpA, and *Escherichia coli* DEAD Protein Specific for 23S Ribosomal RNA. *Biochemistry* **37**, 16989-16996.
- VanBogelen, R.A. und Neidhardt, F.C. (1990). Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(15), 5589-93.
- Vieira, J. und Messing, J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**(3), 259-68.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. und Gay, N.J. (1982). *EMBO*, 945-951.
- Weber, M.H., Beckering, C.L. und Marahiel, M.A. (2001a). Complementation of cold shock proteins by translation initiation factor IF1 in vivo. *J Bacteriol* **183**(24), 7381-6.
- Weber, M.H., Fricke, I., Doll, N. und Marahiel, M.A. (2002). CSDBase: an interactive database for cold shock domain-containing proteins and the bacterial cold shock response. *Nucleic Acids Res* **30**(1), 375-8.
- Weber, M.H., Klein, W., Muller, L., Niess, U.M. und Marahiel, M.A. (2001b). Role of the *Bacillus subtilis* fatty acid desaturase in membrane adaptation during cold shock. *Mol Microbiol* **39**(5), 1321-9.
- Weber, M.H. und Marahiel, M.A. (2003). Bacterial cold shock responses. *Sci Prog* **86**(Pt 1-2), 9-75.

- Weber, M.H., Volkov, A.V., Fricke, I., Marahiel, M.A. und Graumann, P.L. (2001c). Localization of cold shock proteins to cytosolic spaces surrounding nucleoids in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. *J Bacteriol* **183**(21), 6435-43.
- Wendrich, T.M., Beckering, C.L. und Marahiel, M.A. (2000). Characterization of the *relA/spoT* gene from *Bacillus stearothermophilus*. *FEMS Microbiol Lett* **190**(2), 195-201.
- Wendrich, T.M., Blaha, G., Wilson, D.N., Marahiel, M.A. und Nierhaus, K.H. (2002). Dissection of the mechanism for the stringent factor RelA. *Mol Cell* **10**(4), 779-88.
- Wendrich, T.M. und Marahiel, M.A. (1997). Cloning and characterization of a *relA/spoT* homologue from *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **26**(1), 65-79.
- Wiegeshoff, F. (2003). Herstellung von *Bacillus subtilis* - Deletionsmutanten und Charakterisierung mittels 2D - Gelelektrophorese. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
- Wistow, G. (1990). Cold shock and DNA binding. *Nature* **344**(6269), 823-4.
- Wolffe, A.P., Tafuri, S., Ranjan, M. und Familari, M. (1992). The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. *New Biol* **4**(4), 290-8.
- Wu, L. und Welker, N.E. (1991). Temperature-induced protein synthesis in *Bacillus stearothermophilus* NUB36. *J Bacteriol* **173**(15), 4889-92.
- Wulff, D.L., Mahoney, M., Shatzman, A. und Rosenberg, M. (1984). Mutational analysis of a regulatory region in bacteriophage lambda that has overlapping signals for the initiation of transcription and translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 555-559.
- Yoshida, K.I., Fujita, Y. und Ehrlich, S.D. (2000). An operon for a putative ATP-binding cassette transport system involved in acetoin utilization of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182**(19), 5454-61.
- Yu, E. und Owtrim, G.W. (2000). Characterization of the cold stress-induced cyanobacterial DEAD-box protein ChrC as an RNA helicase. *Nucleic Acids Res* **28**, 3926-3934.

7 Anhang

7.1 Primer

Die ***kursiv+fett*** dargestellten Basen bezeichnen die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen. Die unterstrichenen Basen zeigen entweder die Sequenz des T7 Promotors oder den zu den Resistenzkassetten homologen Bereich von Primern für PCR-*knock outs* an. Die entsprechende Resistenzkassette ist dann hinter den Primern vermerkt.

5'kan783(BamHI)	ATA GGA TCC TGA ATT CGA TAA GCT TGC AT
5'kan783(BsmI)	ATA GAA TGC AGG TGA TAG GTA AGA TTA TAC
5'kan783(ClaI)	ATA ATC GAT AGG TGA TAG GTA AGA TTA TAC
5'kan783(NcoI)	TAT CCA TGG AGG TGA TAG GTA AGA TTA TA
5'kan783(SpeI)	TAT ACT AGT TGA ATT CGA TAA GCT TGC AT
3'kan783(BsmI)	ATA GAA TGC TAA AAC ATC AGA GTA TGG ACA
3'kan783(ClaI)	ATA ATC GAT TAA AAC ATC AGA GTA TGG ACA
3'kan783(MluI)	TTA ACG CGT CTA GAG TCG ATA CAA ATT C
3'kan783(NcoI)	ATA CCA TGG TAA AAC ATC AGA GTA TGG ACA
3'kan783(SacII)	TTA CCG CGG TAT GAC CAT GAT TAC GAA TTC
3'kan783(SphI)	TAT GCA TGC TAT GAC CAT GAT TAC GAA TTC
3'kan783(SphI)II	AAA GGA TCC TAT TCT CAG CAA CAG GTT C
5'des_Sonde	TGA TTC AGC TTT TAA ACA CGT
3'des_Sonde+T7	<u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA</u> GAA TCT TCA AAG GTA TGC T
5'cspB_Sonde	ATG TTA GAA GGT AAA GTA AAA TG
3'cspB_Sonde+T7	<u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC</u> TTC TTT AGT AAC GTT AGC A
5'yplP_Sonde	AGC TTC CTG TCT TAA TAA CAG
3'yplP_Sonde+T7	<u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT</u> TGC TGT GTT CAG AAA TGA TC
5'ylaG_Sonde	CAA TGG ACT CTA ATG ATC TTG
3'ylaG_Sonde+T7	<u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC</u> GTC AAG CTT CAT AAG AGA AA
5'yqfR_Sonde	ATG AAG CAG ATC AAT GAT TTG
3'yqfR_Sonde+T7	<u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC</u> TTT CTT TTT TCA GAT TGG TTT C
5'ilvC_Sonde	TTA TAA CGG TGA TAT CAA AGA GA
3'ilvC_Sonde+T7	<u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT</u> GCT TCA GTT AAG GTT TCA AAT
5'yorG_Sonde	AAT CGA TAT TTT CAA CCC ACA A
3'yorG_Sonde+T7	<u>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC</u> TAA GTT TTC TGC AGT AAA TTC
yplP-455(EcoRI)	ATA GAA TTC TTT CAT TTT ATG ATA AGC CCC
yplP+1475(EcoRI)	TAT GAA TTC TCA GTG AAG CAT ATA AAG GTT
ylaG-923(SpeI)	ATA ACT AGT AAT TTG TAA TTT CCA TCC TCG
ylaG+1415(SpeI)	TAT ACT AGT GTC AAA CGT ATG GTT CAA AAT
ydeB-894(SpeI)	ATA ACT AGT TCT ATT AAT AAA TGG AGT CCC
ydeB+1049(SpeI)	TAT ACT AGT AGA TGC TAC AAG GTA ATA GAA
ydjO-891(EcoRI)	ATA GAA TTC CAT CAT ATT AGA AGA TCA GAC
ydjO+536(EcoRI)	TAT GAA TTC TAA TGA TCC GAG CCA TTT AAA
ydjO-20i(NcoI)	TTT CCA TGG TGT ATT TTA CTG CAC ATT TCC
ydjO+9i(NcoI)	TTT CCA TGG TAA CAA ACG AAA TCA AGA ACC
yhfH-688(EcoRI)	ATA GAA TTC TCA ATA AAT CAG CAT CTT TCG
yhfH+1001(EcoRI)	TAT GAA TTC TTT CAT CAC AAG GTT TAC AAC
yhfH-11i(NcoI)	TTT CCA TGG CCT TTG TAG TGA TTT CAT TGT
yhfH+203i(NcoI)	TTT CCA TGG TGA AAT AAT AGT CAG GTT AGG
ylaG_P1	AAC AGC GGA GAA AAA TTG TTC AAG TGC AA
ylaG_P2 (kan)	<u>CGA GCT CGA ATT CGT AAT CAT GGT CAT ATC</u> ATA TTA TAT CAC ACA TCC TCT TTA AAA GC
ylaG_P3 (kan)	<u>GTA TAA TCT TAC CTA TCA CCT CAA ATG GTT</u> GAA TTT GAA AAG ATA GAA CCC GTA CGT TTA
ylaG_P4	ATC CGG TAA GAG GTA TAC TGG ATG AAT TA

<i>veg_P1</i>	AGC AAA GGA AAT TCA ATT GCC ATT TTG CAT
<i>veg_P2 (kan)</i>	<u>CGA GCT CGA ATT CGT AAT CAT GGT CAT AAT</u> TTA TTG TAC AAC
	ACG AGC CCA TTT TTG T
<i>veg_P3 (kan)</i>	<u>GTA TAA TCT TAC CTA TCA CCT CAA ATG GTT</u> CAG TGA ACC TTT
	TGT TTA CTG CTT TTT GTT
<i>veg_P4</i>	TAA TGC AGT TCC GCC ATA GAC ACA AAA T
<i>sigL_P1</i>	TAT TAT CAA GGC TTT AGA GAG AAA ATC GTC
<i>sigL_P2 (kan)</i>	<u>CGA GCT CGA ATT CGT AAT CAT GGT CAT ATT</u> TCT TCA TTG TAC
	ATG ATT GAG ATC ACA C
<i>sigL_P3 (kan)</i>	<u>GTA TAA TCT TAC CTA TCA CCT CAA ATG GTT</u> AGA AAG CGA TAT
	AAA TAA AAT CCT CCC TAG
<i>sigL_P4</i>	ATG TTT TGT CAG CTC TTG TTT CAA TGG CT
<i>ydbR_P1</i>	GGT ACG GGA ACG CAT AAT GAT TAT C
<i>ydbR_P2 (cat)</i>	<u>CTC CTT GCA TGC ACC ATT CCT TCT</u> GCC CTT TAG ACA AGA AGG
	AC
<i>ydbR_P3 (cat)</i>	<u>TTC TAG GAT CCC AAC CGT GAT CTC</u> AAA CGA TCG CCG TTC TTC
	AG
<i>ydbR_P4</i>	AAA GAT TTG CTG GAC AAG GCC C
<i>yqfR_P1</i>	GCC GTA ATC AAA CGG CTC TAT TC
<i>yqfR_P2 (erm)</i>	<u>TCA TCA ACA TCT ACA CCG CCA TAA</u> AGC TCC TTA AAG CGG ACA
	ATT ATG
<i>yqfR_P3 (erm)</i>	<u>GGA GGT GTA GCA TGT CTC ATT CGA</u> AAA GAA AGT AGG GGA ACC
	TGT TG
<i>yqfR_P4</i>	GAG ACG ATT ACA TCG AAA GAA ACA
<i>yqfR5'pX(SpeI)</i>	AAA ACT AGT AGG AGG TGG GAA AAA TGA AAG AAA CGA
<i>yqfR3'pX(BamHI)</i>	AAA GGA TCC TAT TCT CAG CAA CAG GTT C
<i>yqfR5'pX(SpeI)</i>	AAA ACT AGT AGG AGG GTT TTA TAA GTG GTA AAT CAC
<i>yqfR3'pX(BamHI)</i>	AAA GGA TCC CTG AAT AAC AAA TCA CGA ACA T
<i>5'ydbRpQE60</i>	AAA CCA TGG TAA ATC ACG ACA TTA CT
<i>3'ydbRpQE60</i>	ATA AGA TCT GTA AGA TTT TTT CTG GCG TC
<i>5'yqfRpQE60</i>	AAA CCA TGG AAG AAA CGA AAT TTG AAC
<i>3'yqfRpQE60</i>	ATA AGA TCT TTC TTT TCT TAG ATT GTT TTC
<i>BAD5'ydbR</i>	CAC CGT AAA TCA CGA CAT TAC TGA AA
<i>BAD3'ydbR</i>	GTA AGA TTT TTT CTG GCG TCT
<i>BAD5'yqfR</i>	CAC CAA AGA AAC GAA ATT TGA ACT TTA TGA A
<i>BAD3'yqfR</i>	CTT TCT TTT CTT AGA TTG GTT TCT
<i>5'ydbRpSG51(HindIII)</i>	TTA AAG CTT AAA TCG GAC AAG ATA AAC GTG
<i>3'ydbRpSG51(EcoRI)</i>	TAT GAA TTC TCC GTA AGA TTT TTT CTG GCG TCT
<i>5'yqfRpSG51(HindIII)</i>	TTA AAG CTT GAG GCA CTG ATA AAC AAA AAT
<i>3'yqfRpSG51(PstI)</i>	TAT CTG CAG TCC CTT TCT TTT CTT AGA TTG GTT TC

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel, der mit viel Energie und seiner steten Diskussionsbereitschaft meine Arbeit förderte. Durch ihn wurde die fruchtbare Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Uwe Völker und Prof. Dr. Erhard Bremer initiiert, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Lars O. Essen danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Uwe Völker von der Universität Greifswald, seiner gesamten Arbeitsgruppe und insbesondere Leif Steil danke ich für die engagierte Zusammenarbeit, angeregte Diskussionen und ihre herzliche Gastfreundschaft.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises möchte ich für das ausgezeichnete Arbeitsklima danken, das weit über das Labor hinausging. Besonderen Dank möchte ich aussprechen der *cold-shock crew* Karen Hunger und Frank Wiegeshoff für eiskalte Forschung und heiße Zusammenarbeit, meinen Boxkollegen Veit Bergendahl, Dirk Schwarzer und Cordula Klockenbusch für die Unterhaltsamen Stunden im Labor und Thomas Wendrich, der mir den Zugang zur Biochemie gezeigt hat.

Für das schnelle Korrekturlesen des Manuskripts und die zahlreichen Anregungen bedanke ich mich sehr herzlich bei Constanze Reiffurth, Karen Hunger, Frank Wiegeshoff und Cordula Klockenbusch.

Meinen Dank möchte ich auch den Damen und Herren von der Technik, Antje Schäfer, Gabi Schimpff-Weiland, Inge Schüler, Steffi Weimer, Rosi Roller-Müller, Horst Aldag, der Elektronikwerkstatt und dem Glas- und Chemikalienlager aussprechen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, Constanze Reiffurth und ihrer Familie, die durch ihre liebevolle Unterstützung nicht zuletzt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.